

Entgiftung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems durch generalistische Herbivoren der Lepidoptera

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmegite

D i s s e r t a t i o n

von
Inis Britta Winde
aus Braunschweig

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Wittstock
2. Referent: Prof. Dr. Dietrich Ober
eingereicht am: 14.02.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.04.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Winde, I. und Wittstock, U.: Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. *Phytochemistry*, accepted for publication (2011)

Tagungsbeiträge

Winde, I., Wittstock, U.: How do lepidopteran larvae detoxify glucosinolates? (Poster), Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2006, Nürnberg-Heroldsberg (2006)

Winde, I., Schramm, K., Gershenzon, J., Wittstock, U.: No defense without counter-defense – Glucosinolate detoxification in generalist lepidopteran herbivores (Poster), 1. Internationale Glucosinolat-Konferenz, Jena (2006)

Winde, I., Plock, A., Burow, M., Wittstock, U.: Glucosinolate metabolism – Studies at the interface between pharmacy and ecology (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2007, Erlangen (2007)

Winde, I., Schramm, K., Gershenzon, J., Wittstock, U.: Detoxification of isothiocyanates in generalist lepidopteran herbivores (Poster), 2nd Conference on Glucosinolates, Copenhagen (2009)

Winde, I., Wittstock, U.: Glucosinolate detoxification in generalist lepidopteran herbivores (Poster), Botanikertagung 2009 – Plants for the Future, Leipzig (2009)

Danksagung

Meiner Mentorin, Frau Prof. Dr. Ute Wittstock, danke ich für die Überlassung des spannenden Themas. Sehr herzlich möchte ich mich bei meiner Doktormutter für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit, mit der ich das Thema bearbeiten durfte, aber auch die vielen wertvollen Ratschläge und die stets ergiebigen Diskussion bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Dr. Rainer Lindigkeit danke ich für die jederzeit schnelle Hilfe bei jeglichen IT-Problemen und für viele angenehme und ermunternde Gespräche. Dr. Till Beuerle danke ich für die Unterstützung und unzählige gute Ideen zu Analytik und Synthesen.

Für die Einführung in die Arbeiten mit radioaktiven Isotopen, sowie Rat und Tat danke ich Claudine Theuring.

Angelika Berg vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie danke ich für die entgegenkommende und regelmäßige Versorgung mit Gelegen.

Bei Dr. Ulrich Papke bedanke ich mich für die massenspektrometrischen Analysen, die am Institut für Organische Chemie durchgeführt wurden. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ludger Ernst, NMR-Labor der chemischen Institute, für die NMR-Analysen.

Dr. Meike Burow, Katharina Schramm und Dr. Einar Stauber danke ich für ihr Interesse an meinem Thema, ein stets offenes Ohr und die Möglichkeit zu Diskussion und Austausch.

Xi Deng, Jan Dreher, Dr. Johann Grünefeld, Dr. Simone Schröder, Dr. Hendrik Stukenbrock und Prof. Dr. Hermann Wätzig aus der Pharmazeutischen Chemie danke ich für das gute Verhältnis und die nette Zeit bei der Betreuung des Praktikums „Allgemeine und analytische Chemie der anorganischen Arzneistoffe, Hilfsstoffe und Schadstoffe“.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie möchte ich mich für das wunderbare Arbeitsklima und jegliche Unterstützung bedanken. Für die freundschaftliche Atmosphäre im und um das Institut herum danke ich Jennifer Kuchernig, Anja Losansky, Andreas und René Müller, Dr. Helge Scharnhop.

Antje Plock und Dr. Susanne Kühle danke ich für ihre Freundschaft - mit Freunden zusammenarbeiten zu dürfen ist ein Geschenk!

Schließlich danke ich herzlichst meiner Familie und langjährigen Freunden für die rege Anteilnahme, unzählige liebe Worte und ihr Vertrauen.

Für Kraft, Zuversicht und dein unerschütterliches Vertrauen danke ich dir von Herzen Pierre!

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Glucosinolat-Myrosinase-System der Pflanze	3
1.2 Biologische Funktion für die Pflanze	7
1.3 Bekannte Entgiftungsstrategien der Insekten.....	9
1.3.1 Vermeidung der Glucosinolathydrolyse.....	9
1.3.2 Beeinflussung der Hydrolyseproduktbildung	15
1.3.3 Isothiocyanat-Metabolismus durch Konjugation mit Glutathion	20
1.4 Ausgangslage und Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	28
2.1 Organismen	28
2.1.1 Lepidopteren	28
2.1.2 Pflanzen	29
2.2 Analytik	30
2.2.1 Bestimmung der Radioaktivität.....	30
2.2.2 Chromatographische Methoden	30
2.2.2.1 Bedingungen für Radio- und UV-HPLC	32
2.2.2.2 Bedingungen für HPLC-MS/MS	33
2.2.3 Hochauflösende Massenspektrometrie	37
2.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	37
2.3 Synthesen	38

2.3.1 Präparation isotoopenmarkierter Substrate.....	38
2.3.1.1 ¹⁴ C-markiertes Benzylglucosinolat.....	38
2.3.1.2 ¹³ C-markiertes Benzylglucosinolat.....	41
2.3.2 Synthese chemischer Standards für die Strukturaufklärung	42
2.3.2.1 Synthese von <i>N</i> -Benzylmalonaminsäure.....	42
2.3.2.2 Synthese von <i>N</i> -Benzyl-dithiocarbamidsäure- <i>S</i> - <i>D</i> -glucosid	43
2.3.2.3 Synthese weiterer Standards	44
2.4 Fütterungsversuche mit ¹⁴ C-markiertem Benzylglucosinolat.....	45
2.4.1 Versuchsaufbau, Probennahme und Extraktion	45
2.4.2 Optimierung der Fütterungsversuche	47
2.4.3 Vergleich des Metabolismus in <i>S. exigua</i> , <i>S. littoralis</i> und <i>T. ni</i>	50
2.4.4 Untersuchungen zur Zuordnung der Metabolite	52
2.5 Versuche zur Strukturaufklärung.....	53
2.5.1 Fütterungsversuche zur Strukturaufklärung.....	53
2.5.2 Fraktionierung von Kotproben	55
2.5.3 Strukturaufklärung.....	55
2.5.3.1 Detektion von Analyten bekannter Struktur	55
2.5.3.2 Detektion unbekannter Metabolite	57
2.5.3.3 Ermittlung möglicher Strukturen unbekannter Metabolite	58
2.6 Versuche zur Hemmung der Myrosinase	59
3 Ergebnisse	62
3.1 Stoffwechsel von ¹⁴ C-markiertem Benzylglucosinolat.....	62
3.1.1 Optimierung der Fütterungsversuche	62
3.1.2 Vergleich des Metabolitenmusters in <i>S. exigua</i> , <i>S. littoralis</i> und <i>T. ni</i>	67
3.1.3 Zuordnung der Metabolite zu Hydrolyseprodukten und intaktem Glucosinolat.....	69
3.2 Identifizierung von Metaboliten	74
3.2.1 Analyten bekannter Struktur.....	74

3.2.1.1 Benzylglucosinolat.....	75
3.2.1.2 Hippursäure und Phenylacetylglycin.....	77
3.2.1.3 Glutathionkonjugate.....	80
3.2.2 Unbekannte Metabolite	83
3.2.3 Strukturen der unbekannten Metabolite	85
3.3 Einfluss von Darmextrakt auf Myrosinase	89
4 Diskussion	91
4.1 Transgene Pflanzen und isopenmarkierte Tracer als Werkzeuge.....	93
4.2 Sequestrierung und/oder Metabolismus und Ausscheidung?	94
4.3 Ausscheidung von intaktem Benzylglucosinolat.....	97
4.4 <i>N</i> -Benzylmalonaminsäure als Entgiftungsprodukt von Benzylisothiocyanat ...	99
4.5 <i>N</i> -Benzyl-dithiocarbamidsäure- <i>S</i> - <i>D</i> -glucosid – Ein Produkt aus Benzylglucosinolat und Benzylisothiocyanat?	101
4.6 Hippursäure als Metabolit von Phenylacetonitril	102
4.7 Konjugation mit Glutathion – ein Nebenweg der Entgiftung von Isothiocyanaten?	103
4.8 Die Anpassung von generalistischen Lepidoptera an das Glucosinolat-Myrosinase-System: Spezifisch oder unspezifisch?.....	105
5 Zusammenfassung	108
6 Literaturverzeichnis.....	110
7 Anhang	124

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Chemische Struktur der Glucosinolate	4
Abb. 2: Das Glucosinolat-Myrosinase-System der Pflanze und Angriffspunkte von prinzipiellen Entgiftungsstrategien der Insekten.	6
Abb. 3: Versuchsaufbau zur Präparation von ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat ...	38
Abb. 4: Strukturformel mit ^{14}C -Atomen des [1,2,1',2',3',4',5',6'- ^{14}C]Benzylglucosinolat.	40
Abb. 5: Struktur mit ^{13}C -Atom des [1- ^{13}C]Benzylglucosinolat.	41
Abb. 6 : Struktur der N-Benzylmalonaminsäure.....	42
Abb. 7 : Struktur des N-Benzyldithiocarbamidsäure-S-D-glucosid.....	44
Abb. 8: Aufbau eines Fütterungsversuchs mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat..	46
Abb. 9: Stabilität von ^{14}C -Benzylglucosinolat in und auf Blattmaterial.	63
Abb. 10: Einfluß der Applikationsmethode des Tracers auf das Metabolitenmuster.	64
Abb. 11: Abhängigkeit des Metabolitenmusters von der Dauer des Fütterungsversuchs.....	66
Abb. 12: Ausscheidungsprodukte von ^{14}C -Benzylglucosinolat in Kotextrakten von <i>S. exigua</i> , <i>S. littoralis</i> und <i>T. ni</i>	68
Abb. 13: Ausscheidung von intaktem Benzylglucosinolat.....	70
Abb. 14: Metabolite des Benzylisothiocyanats.....	72
Abb. 15: Veränderung des Metabolitenmusters in Abhängigkeit von der Verweildauer des Kots bei Raumtemperatur.....	73
Abb. 16: Nachweis von intaktem Benzylglucosinolat in Kotproben von <i>S. exigua</i> und <i>S. littoralis</i>	76

Abb. 17: Detektion der bekannten Metabolite Hippursäure und Phenylacetylglucin, sowie einer unbekannten Verbindung der Masse m/z 194 $[M+H^+]$ im Kot von <i>S. exigua</i>	78
Abb. 18: Detektion der bekannten Metabolite Hippursäure und Phenylacetylglucin, sowie einer unbekannten Verbindung der Masse m/z 194 $[M+H^+]$ im Kot von <i>S. littoralis</i>	79
Abb. 19: Detektion von Glutathionkonjugaten zweier Isothiocyanate in Kotproben von <i>S. exigua</i> und <i>S. littoralis</i>	82
Abb. 20: Detektion eines Metaboliten mit m/z 346 $[M+H^+]$ in Kotextrakten von <i>S. exigua</i> und <i>S. littoralis</i>	85
Abb. 21: Identifizierung des Metaboliten der Masse m/z 194 $[M+H^+]$ als <i>N</i> -Benzylmalonaminsäure	86
Abb. 22: Identifizierung des Metaboliten der Masse m/z 346 $[M+H^+]$ als <i>N</i> -Benzyl-dithiocarbamidsäure- <i>S</i> - <i>D</i> -glucosid.....	88
Abb. 23: Einfluß von Extrakten aus Raupendärmen oder Darminhalt von <i>S. exigua</i> und <i>S. littoralis in vitro</i> auf die Myrosinaseaktivität	90
Abb. 24: Schematische Darstellung des vermuteten Reaktionsmechanismus der Bildung der <i>N</i> -Benzylmalonaminsäure.	100

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Abhängigkeit des Metabolismus von Glucosinolaten in <i>P. rapae</i> von der Struktur der Seitenkette.....	19
Tab. 2: Selektive Übersicht über Untersuchungen zur Entgiftung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems bzw. der Hydrolyseprodukte durch Konjugation mit Glutathion in herbivoren Insekten.....	24
Tab. 3: Fließmittel-Gradienten für Radio- und UV-HPLC.....	32
Tab. 4: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat.....	33
Tab. 5: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für Hippursäure und Phenylacetylglutathion.....	34
Tab. 6: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für Benzylglucosinolat	34
Tab. 7: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat	35
Tab. 8: HPLC-Gradient und MS/MS-Parameter für den Precursor Ion Scan.....	35
Tab. 9: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für die durch Precursor Ion Scan ermittelte Masse 346 m/z $[M+H]^+$	36
Tab. 10: Übersicht über die verwendeten Präparationen (Tracer) von ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat.....	40
Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Präparationen von ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat.....	41
Tab. 12: Eingesetzte und von Raupen aufgenommene Radioaktivität in Fütterungsversuchen mit <i>S. exigua</i> , <i>S. littoralis</i> und <i>T. ni</i>	51

Tab. 13: Übersicht über die Fütterungsversuche zur Zuordnung der Metabolite zur Umsetzung von intaktem Benzylglucosinolat, Benzylisothiocyanat oder Phenylacetonitril in den Raupen.....	53
Tab. 14: Übersicht über die Fütterungsversuche zur Strukturaufklärung.....	54
Tab. 15: Pipettierschema für den Myrosinaseassay	60
Tab. 16: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in Fraßversuchen.....	69
Tab. 17: Ausscheidungsprodukte nach Verfütterung von Benzylglucosinolat an Larven von <i>S. exigua</i> und <i>S. littoralis</i>	92

Abkürzungsverzeichnis

amu	atomic mass unit
AtNSP	<i>Arabidopsis thaliana</i> Nitril-spezififizierendes Protein
Col-0	Columbia-0
BenzGl	Benzylglucosinolat
Bq	Becquerel
cpm	counts per minute
cps	counts per second
CYP	Cytochrom-P450
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>g</i>	<i>g</i> -Faktor der Zentrifugalbeschleunigung, $1g \approx 9,81 \text{ m/s}^2$
g	Gramm
GOD	Glucose-Oxidase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
l	Liter
M	mol/l; molare Masse
<i>m/z</i>	Masse pro Ladung
MeOH	Methanol
min	Minute
mmu	1/1000 Dalton
MRM	multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Kernresonanz
NSP	Nitril-spezififizierendes Protein
ppm	Parts per million

Prec	Precursor Ion Scan
Q	Quadrupol
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen

1 Einleitung

Der Sekundärstoffwechsel mit seiner Vielzahl unterschiedlicher Produkte gilt als eine Basis der pflanzlichen Abwehr (Hartmann, 2007). Die Sekundärmetabolite können dabei ihre Verteidigungsfunktion auf unterschiedliche Weise entfalten. Sekundärmetabolite können toxisch auf Herbivore und pathogene Bakterien oder Pilze wirken, sie können eine fraßhemmende oder abschreckende Wirkung haben oder als Signalstoffe in der indirekten Abwehr fungieren (Wittstock und Gershenzon, 2003; Kessler und Halitschke, 2007; Dicke und Baldwin, 2010). Jedoch bleibt auf Dauer keine Abwehr unüberwunden. Unter dem Selektionsdruck der Pflanzen mit ihren in Struktur und Wirkung sehr verschiedenartigen Sekundärstoffen kommt es immer wieder zur Ausbildung von Anpassungen, z. B. in herbivoren Insekten. So können Pflanzen trotz ihrer Abwehrstoffe von Insekten als Wirtspflanze genutzt werden. Wie die pflanzlichen Abwehrstoffe sind auch die Mechanismen der Anpassungen vielfältig. Beispiele für Anpassungsmechanismen herbivorer Insekten sind unter anderem die Entstehung von Bindestellen mit einer Unempfindlichkeit gegenüber dem Toxin (Holzinger et al., 1992), die schnelle Ausscheidung des Toxins (Self et al., 1964), die metabolische Entgiftung (Ivie et al., 1983) und/oder die Sequestrierung (Lindigkeit et al., 1997; Hartmann, 1999). Zusätzlich zu diesen biochemischen Anpassungen gibt es Anpassungen auf Verhaltensebene, z. B. in Bezug auf das Fraßverhalten, um eine Intoxikation zu vermeiden (Dussourd und Eisner, 1987). Je nach Breite und Ausprägung der Anpassungsmechanismen gibt es Herbivoren, die verschiedene Pflanzen mit diversen Sekundärmetaboliten nutzen können (Generalisten) und solche, die an spezielle Pflanzen und deren Inhaltsstoffe angepasst sind und daher nur noch diese als Nahrungsnische nutzen (Spezialisten). Durch ihre Anpassung üben Generalisten und Spezialisten nun ihrerseits Selektionsdruck auf ihre Wirtspflanzen aus. Dem kann die Wirtspflanze die Modifikationen ihrer bestehenden Abwehr oder die Entstehung einer gänzlich neuen Abwehr entgegensetzen. Eine neue Runde im evolutionären Wettrüsten („evolutionary armsrace“) wäre eröffnet (Ehrlich und Raven, 1964).

Herbivore Insekten haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um toxische Sekundärstoffe zu umgehen. Darunter sind auch verschiedenste metabolische

Anpassungen, wobei die Insekten in der Regel direkt mit dem Toxin, welches schon als solches im pflanzlichen Material vorliegt, konfrontiert werden. Gut untersuchte Beispiele hierfür sind die Entgiftung der Furanocoumarine (Vorkommen in Apiaceae und Rutaceae) und Pyrrolizidinalkaloide (Vorkommen in Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Apocynaceae und Orchidaceae). Furanocoumarine werden von Lepidoptera der Gattungen *Papilio* und *Helicoverpa* durch Cytochrom-P450-Enzyme der CYP6B Unterfamilie entgiftet (Cohen et al., 1992; Ma et al., 1994; Li et al., 2001). Der Spezialist *Tyria jacobaeae* und der Generalist *Estigmene acrea* (Lepidoptera: Arctiidae) sequestrieren Pyrrolizidinalkaloide und entgiften diese durch *N*-Oxidierung, katalysiert durch eine spezifische flavinabhängige Monooxygenase (Lindigkeit et al., 1997; Hartmann et al., 2005). Beide Mechanismen dienen der direkten Entgiftung der pflanzlichen Toxine.

Glucosinolate sind anionische Thioglucoside und Abwehrstoffe der Brassicales (Fahey et al., 2001). Im Gegensatz zu vielen anderen chemischen Abwehrstoffen sind sie selbst ungiftig. Sie entfalten ihre eigentliche Abwehrwirkung erst, wenn sie mit Myrosinase, einer Thioglucosidase, welche neben den Glucosinolaten in Brassicales vorhanden ist, in Verbindung kommen. Durch schnelle Hydrolyse der Glucosinolate entstehen toxische Isothiocyanate (Senföle) und weitere biologisch aktive Verbindungen (Halkier und Gershenzon, 2006). Die schlagartige Freisetzung großer Mengen dieser Verbindungen bei Gewebeverletzung, z. B. durch kauende Herbivoren, ist ein effektiver Schutz gegen viele generalistische herbivore Insekten (Li et al., 2000; Müller et al., 2010; Hopkins et al., 2009). Im Gegensatz dazu fressen jedoch einige Spezialisten ausschließlich auf glucosinolathaltigen Pflanzen, ohne Schaden zu nehmen. Dies hat Folgen für die Landwirtschaft, da auch ökonomisch wichtige Kulturpflanzen wie Raps und die verschiedenen Varietäten des Kohls betroffen sind (Ahuja et al., 2010). Ebenso wie diese Spezialisten nutzen aber auch die Larven einiger generalistischer Lepidopteren glucosinolathaltige Pflanzen als Wirtspflanzen und verursachen erheblichen agronomischen Schaden (Ahuja et al., 2010). Dies wirft die Frage nach der biochemischen Basis der Anpassung an das Glucosinolat-Myrosinase-System sowie nach Parallelen und Unterschieden in der Anpassung von Generalisten und Spezialisten auf.

1.1 Das Glucosinolat-Myrosinase-System der Pflanze

Die Anzahl der unterschiedlichen, mittlerweile identifizierten Glucosinolate beträgt über 120, wovon viele in Pflanzen der Familie der Brassicaceae nachgewiesen wurden (Fahey et al., 2001). Prinzipiell bestehen Glucosinolate aus drei Grundbausteinen: einem β -D-Glucopyranosylrest, der über ein Schwefelatom mit einem *N*-Hydroximosulfatester verbunden ist und einer variablen Seitenkette [Abb. 1]. Die Seitenkette leitet sich von einer von acht möglichen Aminosäuren ab. Basierend auf der Aminosäure bzw. der daraus abgeleiteten Seitenkette lassen sich die Glucosinolate in drei strukturelle Hauptgruppen einteilen. Die von Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin und Valin abgeleiteten Verbindungen gehören zu den aliphatischen Glucosinolaten. Von Phenylalanin und Tyrosin leiten sich die aromatischen Glucosinolate ab und von Tryptophan die indolischen (Fahey et al., 2001; Mithen, 2001). Die Biosynthese der Glucosinolate kann in drei Schritte untergliedert werden: Modifikationen der Aminosäureseitenkette (wie z. B. Kettenverlängerung von Methionin), Bildung der eigentlichen Glucosinolatgrundstruktur und sekundäre Modifikationen der Seitenkette (z. B. Oxidationsreaktionen wie Hydroxylierung). Die Biosynthese der Kernstruktur umfaßt eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (Cyp450) katalysierte *N*-Hydroxylierung und weitere Oxidationsschritte, eine S-Übertagung durch Konjugation mit einem S-Donor, S-Glucosylierung sowie Sulfatierung (Sønderby et al., 2010). Ein Großteil der an der Glucosinolatbiosynthese in *Arabidopsis* beteiligten Enzyme und Gene ist bereits bekannt (Wittstock und Halkier, 2002; Halkier und Gershenzon, 2006; Benderoth et al., 2009; Sønderby et al., 2010). Hierdurch ist die Erzeugung transgener Pflanzen mit verändertem Glucosinolatprofil möglich, die für Fraßversuche mit Insekten und in Bioassays eingesetzt werden können (Brader et al., 2006; Beekweelder et al., 2008; Müller et al., 2010).

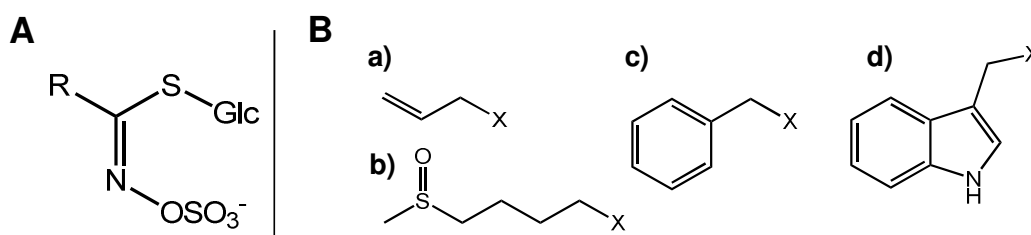


Abb. 1: Chemische Struktur der Glucosinolate. Die Kernstruktur (A) setzt sich aus einem Thiohydroximatesulfatester mit einer variablen Seitenkette R und einem über ein Schwefelatom gebundenen Glucopyranosylrest zusammen. Beispiele für Seitenkettenstrukturen von aliphatischen (a, b), aromatischen (c) und indolischen (d) Glucosinolaten sind in B dargestellt. a, Allylglucosinolat; b, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; c, Benzylglucosinolat; d, Indol-3-ylmethylglucosinolat; X, Glucosinolatgrundstruktur

Das Glucosinolatprofil ist für die einzelnen Arten prinzipiell spezifisch und umfasst eine begrenzte Anzahl der bekannten Strukturen (Fahey et al., 2001). Es variiert aber in Glucosinolatgehalt und Zusammensetzung zwischen einzelnen Individuen, in verschiedenen Pflanzenorganen und Geweben und über die Entwicklungsstadien der Pflanze. Außerdem unterliegt es einer Spanne an Variationen, die durch äußere Faktoren bedingt sind, wie Standort oder Insektenbefall (Kliebenstein et al., 2001; Brown et al., 2003; Velasco et al., 2007; Wentzel und Kliebenstein, 2008; Textor und Gershenzon, 2009).

Speicherort der Glucosinolate sind die sogenannten S-Zellen, die nahe dem Phloem lokalisiert sind. Der Zellinhalt dieser schwefelreichen Zellen setzte *in vitro* unter Myrosinasezusatz Glucose frei. Man geht deshalb davon aus, dass der hohe Schwefel-Gehalt dieser Zellen durch die Glucosinolate bedingt ist (Koroleva et al., 2000). Myrosinase konnte in Arabidopsis in Idioblasten des Phloem-Parenchyms immunohistochemisch (Andreasson et al., 2001) und durch GUS-Reportergen-Konstrukte zusätzlich in Geleitzellen in Blättern, Stiel und Blütenblättern lokalisiert werden (Huseby et al., 2002; Thangstad et al., 2004; Barth und Jander 2006). Dies entspricht einer Kompartimentierung von Glucosinolat und Myrosinase auf zellulärer Ebene. Es gibt aber auch Hinweise für andere Anordnungen von Glucosinolaten und Myrosinase. So wurden in der Aleuronschicht von Samen und Keimlingen von *Brassica juncea* Zellen detektiert, die sowohl Myrosinase als auch Glucosinolat enthielten. In diesem Fall geht man von einer Kompartimentierung auf subzellulärer Ebene aus (Kelly et al., 1998).

Bei Verletzung des Pflanzengewebes wird die Kompartimentierung von Glucosinolaten und Myrosinase aufgehoben. Durch die myrosinase-katalysierte Hydrolyse der Glucosinolate entsteht zunächst ein instabiles Aglycon, welches sich anschließend in die eigentlichen biologisch aktiven Abwehrstoffe, Isothiocyanate, Nitrile, Epithionitrile, Thiocyanate und Oxazolidin-2-thione, umlagert [Abb. 2]. Die Hydrolyseprodukte unterscheiden sich strukturell in ihrer Reaktivität und in ihrer Flüchtigkeit. Einen Einfluß darauf, welche Hydrolyseprodukte gebildet werden, hat u.a. der pH-Wert oder die Anwesenheit von Eisen-Ionen. So werden bei neutralem pH Isothiocyanate gebildet (Bones und Rossiter, 1996; Rask et al., 2000), die Hydrolyseprodukte mit der stärksten Toxizität. Sie entstehen über eine spontan ablaufende Lossen-Umlagerung des Aglycons. Isothiocyanate, die sich von Glucosinolaten mit einer Hydroxygruppe an C-2 ableiten, sind instabil und zyklisieren zu Oxazolidin-2-thionen. Die Entstehung von Nitrilen, Epithionitrilen und Thiocyanaten wird *in vivo* durch spezifizierende Proteine bewirkt (Tookey, 1973; Bernardi et al., 2000; Foo et al., 2000; Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2006; Matusheski et al., 2006; Burow et al., 2009). Diese haben selber keine hydrolytische Aktivität an Glucosinolaten. Wahrscheinlich sind es Enzyme, die die Reaktion des Aglycons zu Epithionitrilen, Nitrilen oder Thiocyanaten katalysieren. Welches Hydrolyseprodukt entsteht, hängt einerseits von der Struktur des Glucosinolats und andererseits von der Art des spezifizierenden Proteins ab (Wittstock und Burow, 2007).

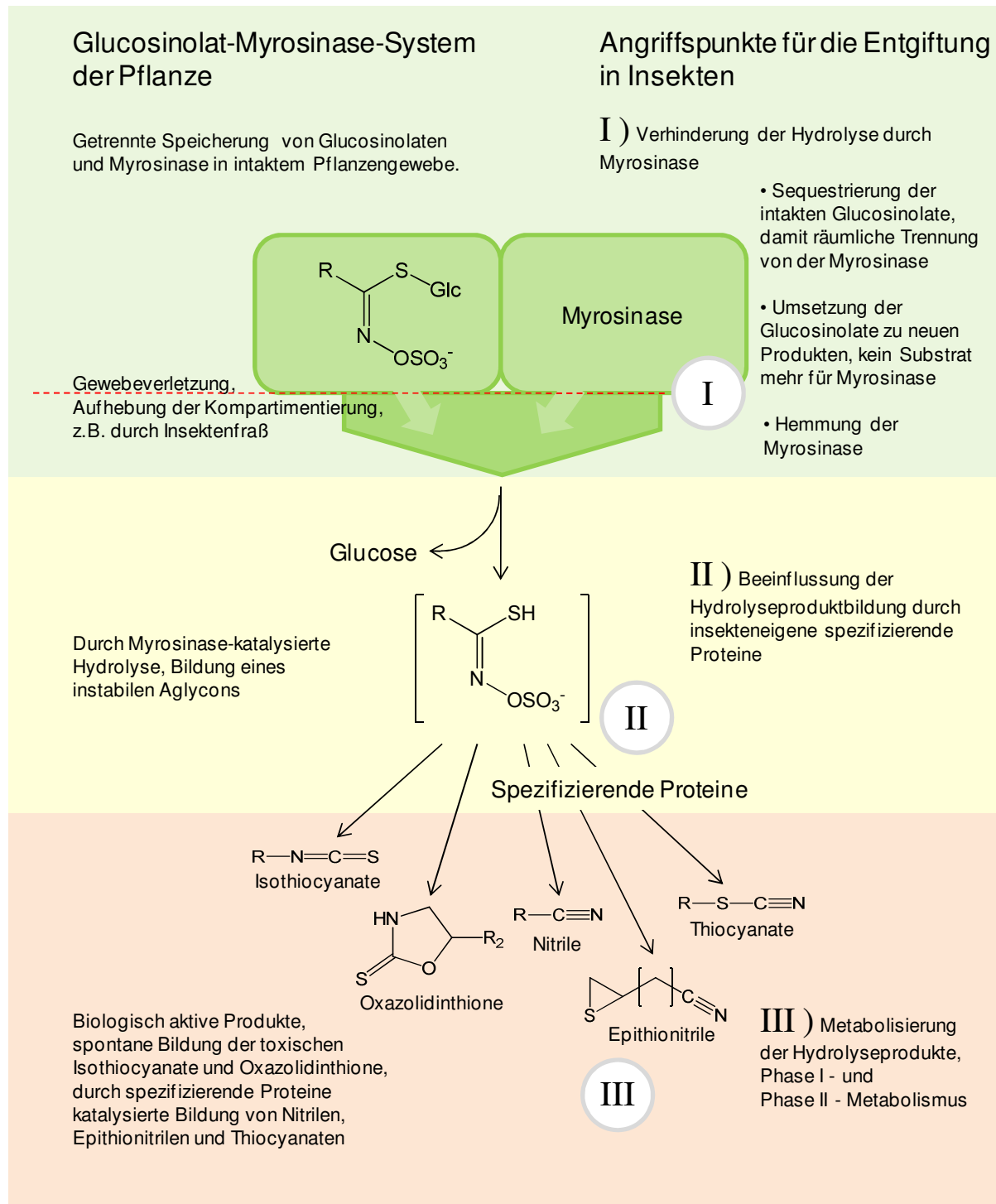


Abb. 2: Das Glucosinolat-Myrosinase-System der Pflanze (linke Seite) und Angriffspunkte von prinzipiellen Entgiftungsstrategien der Insekten (rechte Seite, Punkte I – III).

Die bis dato erlangten Erkenntnisse zum Glucosinolat-Myrosinase-System zeigen, dass die Bezeichnung „Zweikomponenten-System“ dieser pflanzlichen Abwehr nicht gerecht wird. Vielmehr entspricht das Glucosinolat-Myrosinase-System einem System aus zwei Phasen, welche sich durch ihre biologische Aktivität unterscheiden. Die Phase der Glucosinolate bzw. der Glucosinolatbiosynthese ist weniger aktiv, bezogen auf die geringe Reaktivität der Glucosinolate. Die Phase der reaktiven Hydrolyseprodukte ist die biologisch aktive Phase. Zwischen den beiden Phasen gibt es als quasi dritten Zustand den Prozess der Aktivierung. Für beide Phasen bzw. alle Zustände gibt es eine Vielzahl von Feinjustierungsmöglichkeiten. Dadurch kann diese zwar vorgefertigte Abwehr der Pflanze eine an alle denkbaren Situationen angepasste Verteidigung liefern (Kissen et al., 2009; Wittstock und Burow, 2009). Viele dieser Justierungsmöglichkeiten sind noch nicht vollständig untersucht.

1.2 Biologische Funktion für die Pflanze

Die Abwehrfunktion des Glucosinolat-Myrosinase-Systems wird in erster Linie den Isothiocyanaten zugeschrieben, welche universell toxisch sind (Wittstock et al., 2003). Wenn die Wirkungen der verschiedenen Typen von Hydrolyseprodukten eines Glucosinolats getestet wurden, waren Isothiocyanate fast ausnahmslos am stärksten wirksam (Wittstock et al., 2003). In Bioassays mit Insekten und isolierten Isothiocyanaten waren die Isothiocyanate in ihrer Toxizität mit synthetischen Insektiziden vergleichbar (Lichtenstein et al., 1962). Die Effektivität des Glucosinolat-Myrosinase-Systems als chemische Verteidigung wurde auch in Bioassays mit intakten Pflanzen gezeigt. Z.B. wurden Linien von *Brassica juncea* mit hohem Glucosinolat- und Myrosinasegehalt weniger stark von Larven des Generalisten *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) befallen, als Linien mit geringem Glucosinolat- und Myrosinasegehalt (Li et al., 2000). Larven verschiedener Lepidoptera-Arten ohne Spezialisierung auf glucosinolathaltige Pflanzen entwickelten sich wesentlich besser auf Arabidopsis-Mutanten mit sehr geringem Glucosinolatgehalt als auf Pflanzen des Wildtyps (Müller et al., 2010). Unterschiede im Glucosinolatprofil, also in den Glucosinolatseitenketten, scheinen wichtig für den Schutz der Pflanze gegen Befraß von verschiedenen Herbivoren zu sein (Müller et

al., 2010). Über die biologische Aktivität der anderen Hydrolyseprodukte ist nur wenig bekannt, aber einfache Nitrile scheinen weniger toxisch als die korrespondierenden Isothiocyanate zu sein (Wittstock et al., 2003). Dem entsprechend entwickelten sich Larven des Generalisten *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) schneller auf Nitril-, als auf Isothiocyanat-produzierenden Arabidopsis-Linien (Burow et al., 2006a). Die Frage, warum Pflanzen Ressourcen in die Produktion von spezifizierenden Proteinen investieren, deren Aktivität zu weniger giftigen Produkten führt, ist noch nicht abschließend beantwortet. Es gibt aber Hinweise, dass spezifizierende Proteine für den Wechsel von direkter zu indirekter Abwehr nötig sind. Pflanzen nutzen die indirekte Abwehr häufig bei Attacken von Spezialisten. Spezialisten mit ihrer ausgeprägten Anpassung an die Wirtspflanze nutzen deren Abwehrstoffe häufig als Erkennungssignal. So werden weibliche Kohlweißlinge, *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), durch die Glucosinolate in der Blattoberfläche zur Eiablage stimuliert. Außerdem sind Glucosinolate Fraßstimulus für die Larven von *P. rapae* (Hopkins et al., 2009). In Arabidopsis induziert der Befall mit Larven von *P. rapae* die Produktion eines Nitril-spezifisierenden-Proteins, AtNSP1. Bei Gewebeverletzung wird dadurch der Anteil an aus Glucosinolat gebildeten Nitrilen erhöht und der an Isothiocyanaten verringert (Burow et al., 2009). Der erhöhte Nitrilanteil kann zur Anlockung parasitoider Wespen führen, wie experimentell für *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae), einem Spezialisten für *P. rapae*, gezeigt wurde (Mumm et al., 2008). Außerdem kann die erhöhte Nitril- und verringerte Isothiocyanatfreisetzung die Wahrnehmung der Pflanze durch *P. rapae*-Weibchen zur Eiablage verringern (Mumm et al., 2008). Diese Beispiele verdeutlichen noch einmal die Justierbarkeit des Glucosinolat-Myrosinase-Systems.

Die eingangs genannten Entgiftungsstrategien für pflanzliche Abwehrstoffe in herbivoren Insekten (Unempfindlichkeit gegenüber dem Toxin, schnelle Ausscheidung des Toxins, metabolische Entgiftung sowie Sequestrierung) gelten als grundsätzliche Strategien und gehen von einem unmittelbaren Kontakt des Insekts mit dem Toxin aus. Das Glucosinolat-Myrosinase-System bietet der Pflanze zwar eine sehr variable und anpassbare Abwehrmaschinerie, aber dieser Aufbau bietet Insekten auch zusätzliche Angriffspunkte zur Überwindung. In Abb. 2 sind das Glucosinolat-Myrosinase-System und die möglichen Angriffspunkte dargestellt. Es kann erstens die Aktivierung des Systems, also die Hydrolyse der Glucosinolate durch Myrosinase, verhindert werden. So würde es gar nicht erst zur Bildung des

eigentlichen Toxins kommen. Zweitens kann die weitere Reaktion des instabilen Aglycons beeinflusst werden, um die Entstehung toxischer Isothiocyanate zu verhindern. Drittens können schließlich die Isothiocyanate und andere Hydrolyseprodukte enzymatisch entgiftet werden.

1.3 Bekannte Entgiftungsstrategien der Insekten

1.3.1 Vermeidung der Glucosinolathydrolyse

Anpassung des Fraßverhaltens

Eine Möglichkeit, die Glucosinolathydrolyse und damit die Entstehung toxischer Hydrolyseprodukte zu vermeiden, ist, den Kontakt von Myrosinase und Glucosinolat zu verhindern. Dies kann durch die Art der Nahrungsaufnahme erreicht werden, nämlich einen Fraßmodus, bei dem das Pflanzengewebe nur minimal verletzt wird. Blattläuse sind saugende Herbivore. Sie punktieren die saftführenden Gefäße des Phloems, ohne das darüber liegende Gewebe stark zu verletzen. Sie erreichen dies, indem sie das Parenchym mit den Stechborsten interzellulär bis zum saftführenden Gefäß durchdringen. Auf diese Weise bleiben die Parenchymzellen unverletzt und die Kompartimentierung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems wird nicht aufgehoben, die Abwehr bleibt inaktiviert. In generalistischen Blattläusen der Spezies *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) konnten nach Fraß auf Arabidopsis im Körper und im Honigtau, einem zuckerhaltigen Ausscheidungsprodukt der Blattläuse, intakte Glucosinolate nachgewiesen werden (Kim und Jander, 2007). Das Glucosinolatprofil des Honigtaus entsprach mit Ausnahme der indolischen Glucosinolate dem des Phloemsafts. Die indolischen Glucosinolate waren im Vergleich zum Phloemsaft in geringeren Mengen nachweisbar. Für diese Glucosinolate geht man von einer Metabolisierung und Ausscheidung als Konjugate der Ascorbinsäure, des Glutathion oder von Aminosäuren aus (Kim et al., 2008).

In der auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierten Blattlaus *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) wurden im Vergleich zu *M. persicae* bis zu zehnfach höhere

Glucosinolatmengen nachgewiesen, was auf die Sequestrierung von Glucosinolaten durch den Spezialisten schließen lässt (Bridges et al., 2002; Kazana et al., 2007).

Sequestrierung von Glucosinolaten

Die Sequestrierung ist eine Form der Anpassung von Insekten an ihre Wirtspflanzen, die in Insekten vieler Taxa gefunden wird und eine Vielzahl an pflanzlichen Verbindungen umfasst (Opitz und Müller, 2009). Unter Sequestrierung versteht man in der Chemischen Ökologie in Bezug auf Pflanzen-Insekten-Interaktion die Aufnahme von pflanzlichen Sekundärstoffen durch die Darmwand des Insekts. Sequestrierte Pflanzeninhaltsstoffe können mit oder ohne weiteren Metabolismus im Insekt gespeichert werden. In vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Insekten von den sequestrierten Pflanzenabwehrstoffen profitieren, da sie selber dadurch besser gegen Fraßfeinde geschützt sind (Opitz und Müller, 2009).

Die Sequestrierung von Glucosinolaten ist in Insekten verschiedener Ordnungen nachgewiesen worden. Alle diese Glucosinolat-sequestrierenden Insekten sind auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisiert. Durch die Sequestrierung wird nicht nur das pflanzliche Glucosinolat-Myrosinase-System unschädlich gemacht, die Glucosinolate können auch für die eigene Abwehr genutzt werden. Zunächst muss die Hydrolyse der Glucosinolate verhindert, und die Glucosinolate müssen durch einen aktiven Prozess aufgenommen werden, da diese für eine passive Aufnahme zu hydrophil sind. Zur Vermeidung der Hydrolyse gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen kann die Kompartimentierung von Glucosinolat und Myrosinase beim Fraß unbeschädigt bleiben (saugende Herbivoren), oder die Glucosinolate werden aufgenommen, noch bevor sie von der Myrosinase hydrolysiert werden können. Dies würde einen sehr effektiven Transporter und/oder eine Hemmung der Myrosinase erfordern. Bis jetzt wurde für keines der bereits untersuchten, glucosinolatsequestrierenden Insekten der genaue Mechanismus der Glucosinolataufnahme aus dem Darmlumen geklärt. Da aber eine Sequestrierung von Glucosinolaten sowohl bei saugenden, als auch bei kauenden Insekten gefunden wurde, sind beide prinzipiellen Wege der Glucosinolataufnahme in Insekten vorhanden.

Die Blattlaus *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) gehört zu den saugenden Herbivoren. Sie gehört zu den wichtigsten Schädlingen auf Kulturpflanzen der Brassicaceae (Ahuja et al., 2010). In *B. brassicae* wurde im

Vergleich zu dem Generalisten *Myzus persicae*, die beide auf *Brassica nigra* gehalten wurden, ein bis zu zehnfach höherer Glucosinolatgehalt und eine Menge von bis zu 150 ng Allylglucosinolat/Blattlaus nachgewiesen (Bridges et al., 2002). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Glucosinolate in der Haemolymph akkumuliert werden. Außerdem waren sie in Embryos nachweisbar, aber in keinem weiteren Gewebe (Kazana et al., 2007). Der Glucosinolatgehalt ist in flügellosen Blattläusen höher als in geflügelten. Geflügelte Blattläuse scheiden große Mengen Glucosinolat mit dem Honigtau aus, was auf eine schlechtere Aufnahme der Glucosinolate schließen läßt (Kazana et al., 2007). Interessanterweise enthalten *B. brassicae* und eine weitere, auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierte Blattlaus, *Lipaphis erysimi* (Hemiptera: Aphididae), eine eigene Myrosinase. Diese wird, wie bei den Pflanzen, getrennt von den in der Haemolymph zirkulierenden Glucosinolaten gespeichert und hat den Blattläusen die Bezeichnung „walking mustard oil bomb“ eingebracht (Jones et al., 2001; Bridges et al., 2002; Francis et al., 2002; Husebye et al., 2005; Kazana et al., 2007). Durch Immunlokalisation konnten Microbodies mit Myrosinase im Sarkoplasma von Muskelzellen im Kopf- und Thoraxbereich detektiert werden. Bei Verletzung der Blattlaus werden Isothiocyanate freigesetzt. Diese dienen als Warnsignal für die restliche Kolonie (Bridges et al., 2002). Sie dienen aber auch als direkte Abwehr gegen Fraßfeinde, wie Larven von Coccinellidae (Kazana et al., 2007; Pratt et al., 2008). Die Myrosinase aus *B. brassicae* ähnelt der pflanzlichen Myrosinase in ihrer Funktion, weitere Gemeinsamkeiten konnten aber nicht gefunden werden (Jones et al., 2001 und 2002; Francis et al., 2002; Husebye et al., 2005).

Ein weiteres Beispiel für saugende Herbivoren, die Glucosinolate sequestrieren, ist die Harlequinwanze *Murgantia histrionica* (Hemiptera: Pentatomidea). Nach Fraß auf glucosinolathaltigen Pflanzen wurden im Darm und im restlichen Körper Glucosinolate nachgewiesen. Die Glucosinolatkonzentration im Körper (ohne Verdauungsorgane) lag dabei 20- bis 30-fach über der im Darm (Aliabadi et al., 2002). Das Glucosinolatprofil der Wanzen entsprach dem der Pflanzen, auf denen sie gehalten wurden. Wenn *M. histrionica* auf eine andere Futterpflanze umgesetzt wurde, änderte sich das Glucosinolatprofil entsprechend, wobei aber auch nach sechs Tagen noch Glucosinolate der ersten Futterpflanze nachweisbar waren (Aliabadi et al., 2002). In einer früheren Untersuchung wurden Isothiocyanate und Nitrile in einem Sekret des Prothorax identifiziert, die wahrscheinlich von

Glucosinolaten stammen (Aldrich et al., 1996). Das Sekret wird abgegeben, wenn die Wanzen mit einer Pinzette gedrückt werden und entspricht nicht dem Sekret der Geruchsdrüsen. Der Ursprung der Isothiocyanate und Nitrile ist noch unbekannt, ebenso wie eine mögliche Funktion dieser Verbindungen in der Abwehr der Wanze gegen Fraßfeinde.

Die Larven der Sägewespe *Athalia rosae* (Hymenoptera: Tenthrediniae) und weiterer *Athalia*-Arten sind die einzigen kauenden Herbivore, für die eine Glucosinolatsequestrierung gezeigt werden konnte (Müller et al., 2001; Opitz et al., 2010). Dies ist umso erstaunlicher, da durch den kauenden Fraß der Larven die Kompartimentierung von Glucosinolaten und Myrosinase aufgehoben wird. Die Larven akkumulieren die Glucosinolate in der Haemolymphe. Das heißt, sie nehmen die Glucosinolate aus dem Darminhalt auf, bevor diese durch pflanzliche Myrosinase hydrolysiert werden können. Im Darminhalt von Larven von *A. rosae* konnten nach Fraß auf glucosinolathaltigen Pflanzen nur Spuren der entsprechenden Glucosinolate nachgewiesen werden, wohingegen die Glucosinolatkonzentration in der Haemolymphe zehn bis 30-fach über der der Pflanze lag (bis zu 30 $\mu\text{mol g}^{-1}$ Haemolymphe (Frischgewicht)) (Müller et al., 2001). *A. rosae* hat ein sehr weiches Integument und zeigt das Abwehrprinzip des *Easy Bleeding*. Bereits bei geringer Berührung (z.B. durch einen Fraßfeind) wird das Integument verletzt und es tritt ein Tropfen Hämolymphe aus, der u. a. die Glucosinolate enthält, welche so eine Abwehrfunktion haben könnten (Müller et al., 2001; Opitz et al., 2010). Für die verschiedenen Glucosinolate konnten Unterschiede in der Sequestrierung festgestellt werden. Aromatische und aliphatische Glucosinolate werden entsprechend ihres Profils in den Pflanzen aufgenommen. Indolische Glucosinolate hingegen waren in der Haemolymphe nur in geringen Mengen nachweisbar, obwohl Larven auf Pflanzen mit hohem Indolglucosinolatgehalt fraßen (Müller et al., 2001). Die Larven beginnen direkt nach dem Schlüpfen mit der Sequestrierung der Glucosinolate, sobald sie mit dem Fressen beginnen (Müller und Wittstock, 2005). Auch in adulten *A. rosae* sind noch Glucosinolate nachweisbar, hier aber nur die Hauptglucosinolate und diese in geringeren Mengen (Müller und Sieling, 2006). In der Haemolymphe der Larven unterliegen die Glucosinolate einem stetigen *Turn-Over*. Dies konnte in Fraßversuchen gezeigt werden, in denen Larven von einer Pflanze auf eine andere Pflanze mit abweichendem Glucosinolatprofil umgesetzt wurden. Das Glucosinolatprofil der Haemolymphe entsprach kurze Zeit nach dem Wechsel dem

Glucosinolatprofil der neuen Futterpflanze. Bereits nach 30 min war Glucosinolat der neuen Futterpflanze detektierbar, nach 24 h war der Wechsel so gut wie vollständig. Auch Versuche mit radioaktiv markiertem Glucosinolat zeigten eine schnelle Umsetzung der Glucosinolate. Innerhalb eines Tages wurden 80 % der aufgenommenen Radioaktivität wieder ausgeschieden (Müller und Wittstock, 2005). Wie die Glucosinolate umgesetzt und ausgeschieden werden, ist noch nicht bekannt. Der Kot enthält nur Spuren von Glucosinolaten (Müller et al., 2001). Myrosinaseaktivität konnte in keinem Gewebe von *A. rosae* nachgewiesen werden (Müller und Wittstock, 2005). Obwohl eine langsame Umsetzung von Glucosinolaten zu Desulfoglucosinolaten in Haemolymphextrakten detektiert werden konnte, scheint dies *in vivo* kein Hauptabbauweg in der Umsetzung der Glucosinolate zu sein (Müller, 2009).

Metabolismus intakter Glucosinolate

Ein weiterer Weg, das Glucosinolat-Myrosinase-System außer Kraft zu setzen, wäre die schnelle Umsetzung der intakten Glucosinolate, bevor diese durch die pflanzliche Myrosinase hydrolysiert werden können. Die hohe Myrosinaseaktivität der pflanzlichen Gewebe würde hier ein sehr effizientes Metabolisierungsenzym und/oder einen Myrosinaseinhibitor im Mundbereich oder Verdauungstrakt voraussetzen.

Ein solcher Mechanismus wurde für die Kohlschabe oder Kohlmotte, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), gefunden. *P. xylostella* gehört zu den Spezialisten auf Brassicaceae und kommt weltweit vor. Sie gehört zu den ökonomisch wichtigsten Schädlingen auf diesen Pflanzen (Talekar und Shelton, 1993; Sarfranz et al., 2006).

Im Darm von *P. xylostella*-Larven wurde eine Sulfatase, welche die Glucosinolate zu Desulfoglucosinolaten umsetzt, identifiziert (Ratzka et al., 2002). Desulfoglucosinolate sind keine Substrate für die Myrosinase und werden mit dem Kot ausgeschieden (Ratzka et al., 2002). Für die Glucosinolatsulfatase wurde eine gewebe- und entwicklungsspezifische Expression im Larvendarm festgestellt. In Eiern und adulten *P. xylostella* wird sie nicht exprimiert. Das Enzym war als Bande in nativen Polyacrylamidgelen und in SDS-Gelen nach Elektrophorese eines Rohextrakts aus Darmgewebe detektierbar, das heißt, es ist in diesem Gewebe in sehr großen Mengen vorhanden. Die Glucosinolatsulfatase hat eine sehr hohe

Aktivität mit V_{\max} -Werten von bis zu $180 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Eine schnelle Umsetzung von Glucosinolaten mit verschiedenen Seitenkettenstrukturen (aliphatische, aromatische, indolische) wurde in Assays mit Rohextrakt und gereinigtem Protein aus Darmgewebe nachgewiesen, was einer geringen Substratspezifität entspricht. Dies ermöglicht *P. xylostella* das Fressen auf Pflanzen mit unterschiedlichen Glucosinolatprofilen. Die Enzymaktivität der Glucosinolatsulfatase reicht nicht nur aus, um die normalerweise von *P. xylostella* aufgenommene Glucosinolatmenge quantitativ umzusetzen, sondern liegt um ein Vielfaches (für *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0, >100-fach) über der dafür nötigen Enzymaktivität (Ratzka et al., 2002). Dies erklärt auch, warum unterschiedliche Gesamtglucosinolatgehalte von Brassicaceae in Fraßversuchen keinen Einfluß auf *P. xylostella* hatten (Li et al., 2000; Kliebenstein et al., 2002; Müller et al., 2010; Sarosh et al., 2010).

Während die Glucosinolatsulfatase von *P. xylostella* ein konstitutives Enzym ist, wurde in der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) eine induzierbare Glucosinolatsulfatase nachgewiesen (Falk und Gershenzon, 2007). *S. gregaria* ist ein Generalist, zu dessen Futterpflanzen auch die Brassicaceae *Schouwia purpurea* gehört (Ghaout et al., 1991). *S. purpurea* hat im Vergleich zu den meisten anderen Brassicaceae einen sehr hohen Glucosinolatgehalt ($100\text{--}150 \mu\text{mol g Trockengewicht}^{-1}$ in mittelalten Blättern) (Ghaout et al., 1991; Falk und Gershenzon, 2007). Die Hydrolyseprodukte sind hauptsächlich Epithionitrile, was auf das Vorhandensein von ESP schließen lässt (Falk und Gershenzon, 2007). Isothiocyanate hatten in Fraßversuchen eine abschreckende Wirkung auf *S. gregaria*, Glucosinolate jedoch nicht (El Sayed et al., 1996; Mainguet et al., 2000). Die Auswirkung von Epithionitrilen wurde nicht untersucht. Wie das Enzym aus *P. xylostella* hat auch die Glucosinolatsulfatase von *S. gregaria* eine geringe Substratspezifität und setzt aliphatische und aromatische Glucosinolate sowie Indolglucosinolate um (Falk und Gershenzon, 2007). Sowohl in Larven als auch in adulten Insekten, die auf *S. gregaria* gefressen hatten, wurde Glucosinolatsulfatase-Aktivität detektiert. Die Glucosinolatsulfatase von *S. gregaria* wurde induziert, wenn adulte Insekten von einer glucosinolfreien Diät auf *S. purpurea* umgesetzt wurden. Die Induzierbarkeit des Enzyms spiegelt das Fraßverhalten des Generalisten *S. gregaria* wieder, der über die verschiedenen Futterpflanzen mit unterschiedlichen pflanzlichen Abwehrstoffen konfrontiert wird. Sie

ist von physiologischem Nutzen beim Wechsel zwischen verschiedenen Nahrungsquellen (Falk und Gershenzon, 2007).

Die Anpassung an glucosinolathaltige Pflanzen durch eine Glucosinolatsulfatase scheint unter Herbivoren der Lepidoptera nicht weit verbreitet zu sein. Weitere Spezies der Lepidoptera, die auf das Vorhandensein von Glucosinolatsulfase untersucht wurden, sind die fünf Generalisten *Spodoptera exigua*, *S. littoralis*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens* und *Helicoverpa armigera* (Noctuidae), sowie 13 Spezies der Pieridae, von welchen acht Spezialisten auf Brassicaceae sind (Ratzka et al., 2002; Wheat et al., 2007). In keiner der Arten konnte eine Glucosinolatsulfatase detektiert werden. Ein weiterer herbivorer Organismus, der eine Glucosinolatsulfatase besitzt, ist die Weinbergschnecke *Helix pomatia*. Die Sulfatase von *H. pomatia* wird in der Glucosinolatanalytik eingesetzt (Thies, 1979). Ob sie eine Bedeutung für die Glucosinolatentgiftung in *H. pomatia* hat oder ob es sich um ein unspezifisches Enzym ohne eine glucosinolatbezogene Funktion handelt, ist nicht bekannt (Ratzka et al., 2002). Angemerkt sei auch, dass bakterielle Sulfatasen nicht generell Glucosinolate als Substrat akzeptieren (U. Wittstock, persönliche Mitteilung).

1.3.2 Beeinflussung der Hydrolyseproduktbildung

Da die Isothiocyanate die Hydrolyseprodukte mit der stärksten toxischen Wirkung sind, liegt eine weitere Möglichkeit für die Entschärfung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in der Beeinflussung der Bildung der Hydrolyseprodukte.

Dieser Mechanismus wurde zuerst für den Kleinen Kohlweißling *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) entdeckt. *P. rapae* ist einer der häufigsten Schmetterlinge in Nord- und Mitteleuropa. Er ist ein Spezialist auf Glucosinolat-haltigen Pflanzen. Seine Larven sind kauende Herbivoren, auf die Glucosinolate als Fraßstimulus wirken. Nach einmaligem Fraß auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen die Larven ausschließlich auf diesen Pflanzen (Renwick und Lopez, 1999). Trotz dieser Spezialisierung wurde eine toxische Wirkung von Isothiocyanaten auf *P. rapae* nachgewiesen (Agrawal et al., 2003), was zunächst überraschte, aber durch den speziellen Metabolismus der Glucosinolate in *P. rapae* erklärt wird.

Die physiologische Anpassung von *P. rapae* an das Glucosinolat-Myrosinase-System beruht auf der Beeinflussung der Glucosinolathydrolyse durch ein Protein des Raupendarms. Unter dem Einfluss dieses Proteins entstehen bei der Hydrolyse der Glucosinolate durch pflanzliche Myrosinase einfache Nitrile, die offenbar weniger toxisch sind, als die Isothiocyanate (Wittstock et al., 2004). Auf Grund dieser Funktion wurde das Protein Nitril-spezififizierendes Protein (NSP) genannt. NSP besitzt selber keine hydrolytische Aktivität für Glucosinolate. Die Aktivität des NSP kommt nur in Verbindung mit der aus dem gefressenen Pflanzenmaterial stammenden Myrosinase und der durch sie katalysierten Glucosinolathydrolyse zum Tragen. Der biochemische Mechanismus der NSP-Aktivität ist noch nicht geklärt. Wahrscheinlich bindet NSP als Enzym an das intermediär von der Myrosinase gebildete Aglycon und katalysiert dessen weitere Umsetzung zum Nitril. Funktionell ist NSP mit den in Pflanzen vorkommenden spezifizierenden Proteinen verwandt (Bernardi et al., 2000; Foo et al., 2000; Lambrix et al., 2001; Wittstock und Burow 2007), zeigt zu diesen aber keine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (Wittstock et al., 2004). Das NSP der Larven hat wie AtNSP1 und AtNSP2 aus Arabidopsis, aber im Gegensatz zu dem epithiospezififizierenden Protein aus Arabidopsis, eine geringe Substratspezifität und ist nicht abhängig von Fe^{2+} -Ionen (Burow et al., 2006; Burow et al., 2009).

NSP-Aktivität scheint eine spezielle Anpassung von glucosinolatfressenden Spezies der Pieridae zu sein, da NSP-Aktivität nur in weiteren Spezies der Familie Pieridae, nicht aber in anderen Familien (Noctuidae, Plutellidae) nachgewiesen werden konnte (Wheat et al., 2007). Von 13 untersuchten Spezies der Pieridae wurde in acht Spezies NSP-Aktivität nachgewiesen. Diese acht Spezies gehören zur Unterfamilie Pierinae und hier zu denen, die auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen. Die Wirtspflanzen der fünf Spezies der Pieridae, in denen keine NSP-Aktivität detektiert wurde, enthalten keine Glucosinolate. Das verdeutlicht den direkten Zusammenhang zwischen NSP-Aktivität und Anpassung an die Wirtspflanze und lässt auf einen gemeinsamen Ursprung dieses Mechanismus schließen. Der Ursprung des NSP, das im Kontext der Theorie der Koevolution (Ehrlich und Raven, 1964) als Schlüsselinnovation anzusehen ist, liegt 80 Millionen Jahre zurück und lässt sich auf nur 10 Millionen Jahre nach der Entstehung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in Brassicaceae datieren. Dies entspricht einer sehr schnellen und dynamischen

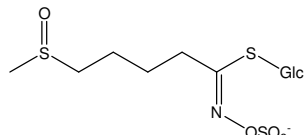
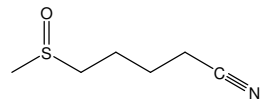
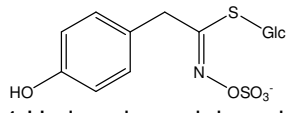
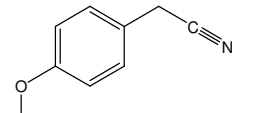
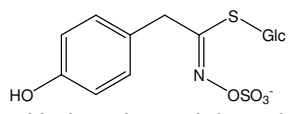
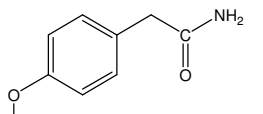
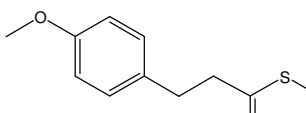
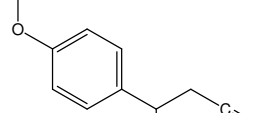
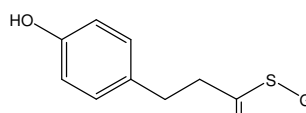
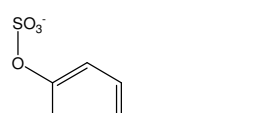
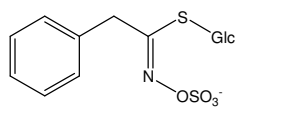
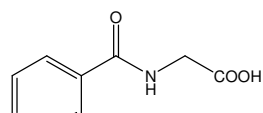
Anpassung der Insekten auf veränderte Abwehrstoffe in Pflanzen (Wheat et al., 2007).

Die NSP-bedingte Nitril-Bildung stellt den ersten Schritt des Glucosinolatmetabolismus von *P. rapae* dar. In Abhängigkeit von ihrer Struktur werden die gebildeten Nitrile unverändert mit dem Kot ausgeschieden oder vor der Ausscheidung weiter metabolisiert (Müller et al., 2003; Wittstock et al. 2004; Agerbirk et al., 2006; Vergara et al., 2006; Agerbirk et al. 2007; Agerbirk et al., 2010). Die quantitative Ausscheidung von zwei Nitrilen aliphatischer Glucosinolate in unveränderter Form wurde für *P. rapae*, die auf *A. thaliana* Col-0 gefressen hatten, nachgewiesen (Wittstock et al., 2004). Die Nitrile phenolischer Glucosinolate und des Benzylglucosinolats werden jedoch weiter metabolisiert. Im Vergleich zu dem „universell“ wirksamen NSP mit seiner geringen Substratspezifität sind die weiterführenden Metabolisierungsreaktionen der Nitrile recht spezifisch für bestimmte Strukturen. Eine Übersicht über den Metabolismus verschiedener Nitrile wird in Tab. 1 gegeben. Nitrile mit freier phenolischer Hydroxygruppe (4-Hydroxyphenylacetonitril) wurden als sulfatierte Metabolite mit dem Kot ausgeschieden (Müller et al., 2003; Wittstock et al., 2004; Agerbirk et al., 2006; Agerbirk et al., 2010). Die Metabolite wurden nicht nur im Kot von *P. rapae* sondern auch im Kot von vier weiteren Arten der Unterfamilie Pierinae nachgewiesen, die auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisiert sind (Agerbirk et al., 2006). Neueste Untersuchungen des Metabolismus von Nitrilen von Methoxyphenylglucosinolaten in *P. rapae* legen nahe, dass diese demethyliert und anschließend sulfatiert werden (Agerbirk et al., 2010). Die entsprechenden Metabolite wurden bei Frassversuchen im Kot von *P. rapae* detektiert. Bei Verfütterung von Pflanzen mit seitenkettenverlängerten, phenolischen Glucosinolaten wurden Metabolite mit Hydroxylierung der Seitenkette in der β -Position gefunden. Metabolite, die alle Reaktionen durchlaufen haben können, wurden bei entsprechender Komplexität der Glucosinolate (2-(4-Methoxyphenyl)-ethylglucosinolat) gefunden (Agerbirk et al., 2010). Zu diesen Metabolisierungsreaktionen auf Insektenseite kommt in Abhängigkeit von der Futterpflanze noch ein weiterer pflanzlicher Faktor hinzu. Viele Pflanzen der Brassicaceae besitzen Nitrilasen bzw. Nitrilhydratasen, welche Nitrile im ersten Fall zur freien Carbonsäure, im zweiten Fall zum entsprechenden Amid umsetzen. Eine Beteiligung dieser Nitrilasen bzw. Nitrilhydratasen am pflanzlichen Glucosinolatmetabolismus wird vermutet, ist aber noch nicht abschließend geklärt

(Vorwerk et al., 2001; Ishikawa et al., 2007; Piotrowski, 2008; Agerbirk et al., 2008; Janowitz et al., 2009). Im Kot von *P. rapae*-Larven, die glucosinolathaltige Pflanzen mit Nitrilase- bzw. Nitrilhydratase-Aktivität gefressen hatten, waren neben den metabolisierten Nitrilen auch Carbonsäuren bzw. Amide der phenolischen Nitrile als Nebenmetabolite nachweisbar. Die aus der weiteren Entgiftung der Nitrile resultierenden Substitutionsmuster wurden zum Teil auch bei den Carbonsäuren und Amidien gefunden (Agerbirk et al., 2007; Agerbirk et al. 2010). Eine geringe Nitrilaseaktivität wurde auch für *P. rapae* in *in vitro* Assays mit Rohextrakt aus Raupendarm gefunden. Jedoch scheint die Aktivität zu gering zu sein, um für das Ausmaß der im Kot gefundenen Carbonsäuremetabolite verantwortlich zu sein (Agerbirk et al., 2010). Ob die Produkte der pflanzlichen Nitrilase einen negativen Effekt auf *P. rapae* haben, ist noch nicht geklärt.

Für Phenylacetonitril, das Nitril des Benzylglucosinolats, wurden in Fütterungsversuchen mit isopenmarkiertem Glucosinolat Hippursäure (Benzoylglycin) als Hauptmetabolit und Phenylacetyl-glycin und *N*-Benzoylisoserin als Nebenmetabolite im Kot von *P. rapae* nachgewiesen (Vergara et al., 2006 und 2007 (Erratum)). Die Mechanismen, welche zur Bildung dieser Metabolite führen, sind noch nicht geklärt. Die Metabolisierung zur Hippursäure ist aber unabhängig von pflanzlicher Nitrilase (E. Stauber, P. Kuczka und U. Wittstock, unveröffentlichte Daten). Für die entsprechenden phenolischen Carbonsäuren (4-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxyphenylelessigsäure) konnten keine Glycinkonjugate nachgewiesen werden (Agerbirk et al., 2010).

Tab. 1: Abhängigkeit des Metabolismus von Glucosinolaten in *P. rapae* von der Struktur der Seitenkette. Pflanzen mit unterschiedlichen Hauptglucosinolaten wurden an Larven von *P. rapae* verfüttert. Der Kot wurde gesammelt und auf Glucosinolatmetabolite analysiert. Angegeben sind das Glucosinolat und die dieses Glucosinolat enthaltende Wirtspflanze, mit der die Fraßversuche durchgeführt wurden, sowie Metabolite, die im Kot von *P. rapae* detektiert wurden und den entsprechenden Glucosinolaten zugeordnet werden.

Glucosinolat, Pflanze	Metabolit in <i>P. rapae</i>	Kommentar	Literatur
 <p>4-Methylsulfinylbutylglucosinolat <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0</p>	 <p>5-Methylsulfinylpentanenitril</p>	Hauptmetabolit	Wittstock et al., 2004
 <p>4-Hydroxybenzylglucosinolat <i>Sinapis alba</i></p>	 <p>4-Hydroxyphenylacetone nitril sulfat</p>	Hauptmetabolit, auch mit isoto­penmarkiertem Glucosinolat nachgewiesen	Müller et al., 2003 Wittstock et al., 2004 Agerbirk et al., 2007
 <p>4-Hydroxybenzylglucosinolat <i>Sinapis arvensis</i></p>	 <p>4-Hydroxyphenylacetamid sulfat</p>	Nebenmetabolit (Pflanze mit Nitrilhydratase)	Agerbirk et al., 2007
 <p>4-Methoxyphenethylglucosinolat <i>Arabis soyeri</i></p>	 <p>4-(2-Cyano-1-hydroxyethyl)-phenyl sulfat</p>	Hauptmetabolite, auch durch Auftragen des isolierten Glucosinolats auf zwei Brassicaceae nachgewiesen	Agerbirk et al., 2010
 <p>4-Hydroxyphenethylglucosinolat <i>Arabis hirsuta</i></p>	 <p>4-(2-Carboxy-1-hydroxyethyl)-phenyl sulfat</p>	Nebenmetabolit, Hauptmetabolit ist das Nitril (siehe eine Zeile darüber) (Pflanze mit Nitrilaseaktivität)	Agerbirk et al., 2010
 <p>Benzylglucosinolat <i>Tropaeolum majus</i></p>	 <p>Hippursäure</p>	Hauptmetabolit, auch mit isoto­penmarkiertem Glucosinolat nachgewiesen	Vergara et al., 2007

1.3.3 Isothiocyanat-Metabolismus durch Konjugation mit Glutathion

Die bis hierher beleuchteten Anpassungsmechanismen von Insekten an das Glucosinolat-Myrosinase-System sind von ihrem Prinzip her keine Entgiftungsreaktionen, da die Entstehung der eigentlich toxischen Verbindungen verhindert wird. Die von den meisten Herbivoren beim Fraß von glucosinolathaltigen Pflanzen aufgenommenen Glucosinolatabbauprodukte sind aber wahrscheinlich die Isothiocyanate. Bei der Metabolisierung der Isothiocyanate handelt es sich um eine Entgiftungsreaktion im eigentlichen Sinne. Diese Entgiftung wurde recht detailliert in Menschen/Säugetieren untersucht, da glucosinolathaltige Pflanzen nicht nur wichtige Gemüse und Gewürze liefern, sondern ihnen auch eine positive Wirkung auf die Gesundheit zugeschrieben wird. Der scharfe Geschmack von Senf, Meerrettich oder Wasabi rührt z. B. von den Isothiocyanaten her, die bei der Zubereitung oder beim Kauen entstehen. Isothiocyanate können im menschlichen Verdauungstrakt auch nach dem Verzehr intakter Glucosinolate durch Hydrolyse durch Enzyme der intestinalen Mikroflora gebildet werden (Krul et al., 2002). Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften werden die Isothiocyanate passiv von den Epithelzellen aufgenommen. Würden sie nicht metabolisch entgiftet werden, könnten sie die Zelle schädigen, da sie leicht mit Aminogruppen von Proteinen reagieren und *in vitro* auch Disulfidbindungen spalten können (Kawakishi und Kaneko, 1985 und 1987). Im Menschen und in Säugetieren werden Isothiocyanate aber direkt nach der Aufnahme in die Zelle mit Glutathion konjugiert (Kassahun et al., 1997; Traka und Mithen, 2009). Bei physiologischem pH und durch die hohe intrazelluläre Glutathionkonzentration kann diese Reaktion spontan ablaufen, die Reaktion könnte aber auch anteilig durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert sein (Traka und Mithen, 2009). Die Konjugate werden aktiv aus der Zelle transportiert und werden entweder über den Mercaptursäureweg renal ausgeschieden oder dissoziieren wieder zu freien Isothiocyanaten (Janobi et al., 2006; Traka und Mithen, 2009).

Insekten, die auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen, nehmen im Vergleich zu Säugetieren in Relation zu ihrem Körpergewicht wesentlich größere Mengen an Glucosinolaten bzw. den daraus abgeleiteten Isothiocyanaten auf. Da die Giftigkeit der Isothiocyanate für Lepidopteren mit der synthetischer Insektizide vergleichbar ist (Wittstock et al., 2003), benötigen sie sehr effektive Stoffwechselprozesse, um eine

Intoxikation zu vermeiden. Die Konjugation mit Glutathion ist eine klassische und ubiquitäre Phase-2-Entgiftungsreaktion. Da Generalisten mit pflanzlichen Abwehrstoffen unterschiedlicher Struktur konfrontiert werden, sind spezielle Anpassungen an das Glucosinolat-Myrosinase-System eher unwahrscheinlich und es wird davon ausgegangen, dass sie direkt mit den Hydrolyseprodukten konfrontiert werden. Deshalb wurde in verschiedenen Studien untersucht, ob die Entgiftung der Isothiocyanate in Insekten durch Konjugation mit Glutathion erfolgt [Tab. 2]. Ein Beweis für die Bildung von Konjugaten *in vivo* wurde aber bis jetzt nicht erbracht. In keiner der Studien wurde die Ausscheidung von Konjugaten oder daraus abgeleiteten Metaboliten der Isothiocyanaten durch Insekten gezeigt.

GST-Aktivität für Isothiocyanate als Substrat konnte in Darmextrakten der beiden generalistischen Lepidopteren *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni* (beides Noctuidae) gezeigt werden (Wadleigh und Yu, 1988). Gemessen wurde die GST-Aktivität über die Abnahme an Glutathion im Reaktionsansatz. Ein Glutathionverbrauch konnte nur bei Anwesenheit von Allylisothiocyanat und Benzylisothiocyanat, nicht aber 2-Phenylisothiocyanat gemessen werden. Die GST-Aktivität in Darmextrakten von *S. frugiperda* für Allylisothiocyanat war durch verschiedene Sekundärstoffe einschließlich Allylisothiocyanat induzierbar. Die stärkste Induktion wurde durch Indol-3-acetonitril, ein Hydrolyseprodukt des Indol-3-ylmethylglucosinolat, erreicht. GST-Aktivität für Benzylisothiocyanat wurde dagegen am stärksten durch das Substrat Benzylisothiocyanat selbst induziert. In Darmextrakten von *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), einem Herbivor der nicht auf glucosinolathaltigen Pflanzen frisst, konnte auch nach Induktion keine GST-Aktivität für Isothiocyanate gemessen werden, wohl aber für bestimmte synthetische Verbindungen (halogenierte Nitrobenzene), die häufig für die Bestimmung von GST-Aktivität verwendet werden (Wadleigh und Yu, 1988; Yu, 1987). Dies könnten Hinweise für eine recht spezifische GST-Aktivität in Darmgewebe der beiden auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressenden Spezies sein. Allerdings entsprachen die Versuchsbedingungen nicht den physiologischen Bedingungen. Der für die GST-Assays gewählte pH (6.5 - 6.8) war geringer als der pH in Zellen (7 - 7.5), wo es am wahrscheinlichsten zur Konjugation von Glutathion und Isothiocyanat käme. Im Darminhalt der meisten Lepidopteren, wo eine spontane Konjugatbildung vorstellbar wäre, herrscht ein basischer pH. Eine bei pH > 7 spontane Reaktion von Isothiocyanaten und Glutathion wurde in verschiedenen

Studien gezeigt und kann somit nicht ausgeschlossen werden (Kawakishi und Kaneko, 1985; Kolm et al., 1995). Auch das äquimolare Verhältnis von Glutathion und Isothiocyanat entspricht in den genannten Versuchen nicht dem, wie es in der Zelle zu erwarten ist (Überschuß an Glutathion gegenüber dem Substrat).

In verschiedenen Studien wurde die GST-Aktivität in Generalisten unterschiedlicher Familien nach Fraß auf glucosinolathaltigen Pflanzen oder nach Fütterung einer Diät mit synthetischen oder natürlichen Xenobiotika beobachtet. In allen diesen Studien wurden aber synthetische Substrate (und nicht Isothiocyanate) für die Bestimmung der GST-Aktivität verwendet. Eine Induktion der GST-Aktivität wurde in Assays mit Darmextrakt von *S. frugiperda* (Yu, 1982) und mit gereinigter GST aus *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) (Francis et al., 2005) nach Fraß auf glucosinolathaltigen Pflanzen gemessen. Das Ausmaß der Induktion korrelierte mit der Glucosinolatkonzentration der Pflanzen. Ebenso wurde eine GST-Induktion in Darmextrakten von *S. frugiperda* und *T. ni* nach Verfütterung einer Diät mit Indol-3-carbinol- und Indol-3-acetonitril-Zusatz festgestellt (Wadleigh und Yu, 1987 und 1988). Indol-3-carbinol ist ein Abbauprodukt des instabilen Indol-3-ylmethylisothiocyanats (Chevoleau et al., 1997; Agerbirk et al., 1998). Diese Studien zeigen wahrscheinlich eher die generelle Entgiftungskapazität der Herbivoren nach Induktion und nicht die des spezifischen Entgiftungsprozesses für Isothiocyanate.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Polyphagie und GST-Aktivität wurde im Vergleich von *T. ni* und *S. frugiperda* festgestellt. *T. ni* hat eine stärkere Präferenz für Pflanzen der Brassicaceae als *S. frugiperda*. In Enzymassays mit Darmextrakten konnte für *T. ni* gegenüber *S. frugiperda* eine größere Umsetzung von Glutathion mit Allyl- und Benzylisothiocyanat gemessen werden. Diese Umsetzung zeigte aber eine geringere Induzierbarkeit (Wadleigh und Yu, 1988). Aus der löslichen Fraktion von Darmextrakt von *T. ni* konnte eine GST, aus der von *S. frugiperda* konnten sechs GSTs durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Yu, 1989). Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse wäre die Anpassung der Insekten an die unterschiedliche Breite des Wirtspflanzenspektrums. *T. ni* hat im Vergleich zu *S. frugiperda* ein schmaleres Wirtspflanzenspektrum mit einer gewissen Präferenz für Brassicaceae und könnte damit mit einer geringeren Bandbreite an Sekundärstoffen konfrontiert werden, mit diesen jedoch in höheren Konzentrationen. Es wären also weniger Entgiftungsenzyme, diese aber mit einer größeren Aktivität, dafür mit geringerer Induzierbarkeit vorstellbar.

Als weitere allgemeine Entgiftungsreaktion wurde in Mikrosomen, die aus Raupendärmen von *S. frugiperda* isoliert wurden, die Cytochrom P450 abhängige Metabolisierung von 2-Phenylethylisothiocyanat, Indol-3-carbinol und Indol-3-acetonitril untersucht (Yu, 1987). Die Inkubation der Mikrosomen mit diesen Substraten führte zu einer zeitabhängigen Oxidation von NADPH. Diese Reaktion war durch CO inhibierbar. Die Reaktionsprodukte wurden nicht identifiziert, dennoch könnten die Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung oxidativer Prozesse an der Entgiftung der Hydrolyseprodukte schließen lassen.

Tab. 2: Selektive Übersicht über Untersuchungen zur Entgiftung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems bzw. der Hydrolyseprodukte durch Konjugation mit Glutathion in herbivoren Insekten. Die GST-Aktivität wurde über die Abnahme von Glutathion ermittelt. 3,4-Dichloronitrobenzen (DCNB), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 2,4-Dinitro-1-iodobenzen (DNIB)

Insekt, Gewebepräparation	Substrate	Kommentar	Literatur
<i>S. frugiperda</i> Lösliche Fraktion des Darmextrakts	DCNB	Induzierbar, stärkste Induktion durch Fraß auf Brassicaceae	Yu, 1982
<i>S. frugiperda</i> Lösliche Fraktion des Darmextrakts	α - β -ungesättigte Xenobiotika als Substrat (Bsp.: trans-4-Phenyl-3-buten-2-on)	Induzierbar durch Indol-3-carbinol, Indol-3-acetonitril und weitere Xenobiotika; Inhibierbar durch Triphenyltinchlorid und Quercetin	Wadleigh und Yu, 1987
<i>S. frugiperda</i> <i>T. ni</i> Lösliche Fraktion des Darmextrakts	Allyl- und Benzylisothiocyanat	Induzierbar durch Allyl- und Benzylisothiocyanat, Indol-3-carbinol, Indol-3-acetonitril und weitere Xenobiotika	Wadleigh und Yu, 1988
<i>S. frugiperda</i> <i>T. ni</i> GST, aufgereinigt aus löslicher Fraktion des Darmextrakts (Affinitätschromatographie)	CDNB, DCNB	Induzierbar und inhibierbar durch Xenobiotika, Aufreinigung von einer GST aus <i>T. ni</i> , sechs GSTs aus <i>S. frugiperda</i> (der ausgeprägter polyphagen Spezies)	Yu, 1989
<i>M. persicae</i> GST, aufgereinigt aus löslicher Fraktion des Insektenextrakts (Affinitätschromatographie)	CDNB, DNIB	Induzierbar durch Fraß auf Brassicaceae, Allyl-, Benzylisothiocyanat	Francis et al., 2005

1.4 Ausgangslage und Zielsetzung

Das Glucosinolat-Myrosinase-System ist zwar eines der am besten untersuchten pflanzlichen Abwehrsysteme. Wie es Insekten gelingt, diese Abwehr zu durchbrechen, ist dagegen nur wenig untersucht. Die bisher gemachten Studien zeigen aber bereits deutlich, dass Insekten verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um durch das Glucosinolat-Myrosinase-System geschützte Pflanzen als Wirts- bzw. Futterpflanzen nutzen zu können. Interessanterweise beruhen hier die meisten Mechanismen darauf, die Entstehung der toxischen Isothiocyanate von vornherein zu verhindern. Diese Anpassungsstrategien der Insekten sind durch den Aufbau des Glucosinolat-Myrosinase-Systems möglich, daher aber auch hochspezifisch für dieses System. Eine konstitutive Abwehr in Form eines aktivierbaren Systems bedingt zwar eine geringere Belastung der Pflanze durch Vermeidung der Selbstintoxikation, bietet aber zusätzlich zur Entgiftung des eigentlichen Toxins (Abb. 2, Punkt III) noch zusätzliche Angriffspunkte, die Abwehr zu umgehen (Abb. 2, Punkt I und II). Für die Verhinderung der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse (Abb. 2, Punkt I) sind zwei Mechanismen belegt: Sequestrierung, ein bei Insekten weit verbreitetes Anpassungsprinzip (Opitz und Müller, 2009) und die Umsetzung der Glucosinolats zu Desulfoglucosinolaten, was einem Substratzug der Myrosinase entspricht. Beide Reaktionen müssen, insbesondere bei kauenden Insekten, so schnell und quantitativ ablaufen, dass sie mit der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse konkurrieren können. Umso erstaunlicher ist es, dass eine Hemmung der Myrosinase noch in keinem der untersuchten Insekten gefunden wurde, weder in Kombination mit Mechanismen wie Sequestrierung, noch als alleinige Anpassung. Ein weiterer Angriffspunkt, um die Entstehung der Isothiocyanate zu verhindern, ist die Beeinflussung der Hydrolyse (Abb. 2, Punkt II). Dies ist durch insekteneigene spezifizierende Proteine möglich. Durch das insekteneigene NSP entstehen Nitrile an Stelle der toxischen Isothiocyanate. Ein Stück weit gleicht dies der Wahl des geringeren Übels, so sind die Nitrile weniger toxisch, einige werden aber vor der Ausscheidung weiter metabolisiert. Viele dieser weiterführenden Entgiftungsreaktionen entsprechen klassischen Phase-1- und Phase-2-Reaktionen. Die Frage, ob diese Biotransformationsreaktionen nach der Schlüsselinnovation NSP (Wheat et al., 2007)

einer weiteren sukzessiven Anpassung sowohl auf Pflanzen-, als auch auf Herbivorseite unterlagen, könnte durch die weitere Aufklärung der beteiligten Enzyme beantwortet werden. Für NSP konnte bereits ein evolutionärer Zusammenhang zwischen phylogenetischer Verwandtschaft und Anpassung an die Wirtspflanze gezeigt werden.

Während die Anpassungsmechanismen einiger saugenden und kauenden Spezialisten bereits genauer untersucht wurden, sind diese für generalistische Herbivoren, die kauend fressen, noch weitestgehend unbekannt. Dabei handelt es sich auch hier um landwirtschaftlich wichtige Schädlinge. Für polyphage Insekten werden bisher vor allem klassische Entgiftungsreaktionen, wie die durch GST katalysierte Konjugation der Isothiocyanate mit Glutathion diskutiert (Abb. 2, Punkt III). Umso bemerkenswerter ist, dass für die kauend fressende, generalistische Heuschrecke *S. gregaria* ein so spezieller Anpassungsmechanismus wie die Glucosinolatsulfatase nachgewiesen wurde. Bis auf dieses eine Beispiel liegen die genauen Mechanismen der Entgiftung bzw. Umgehung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems durch Generalisten noch weitestgehend im Dunkeln. Resultierend aus dem guten Kenntnisstand des Glucosinolat-Myrosinase-Systems auf der Pflanzenseite ergeben sich heute neue Möglichkeiten, die Überwindung dieses Systems durch Generalisten zu untersuchen. Besonders der Einsatz transgener Arabidopsis-Linien mit verändertem Glucosinolat- oder Hydrolyseproduktprofil ermöglichen eine gezieltere Untersuchung der metabolischen Prozesse.

Zielsetzung der Arbeit war die Klärung der Mechanismen, die es Larven generalistischer Herbivoren der Lepidoptera mit kauendem Fraßverhalten ermöglichen, auf Pflanzen zu fressen, die durch das Glucosinolat-Myrosinase-System geschützt sind. Gewählt wurde hierfür eine grundsätzlich ergebnisoffene Herangehensweise, welche ein möglichst umfangreiches Bild der Stoffwechselprozesse liefern sollte. Als Modellorganismen wurden die beiden Generalisten *Spodoptera exigua* und *S. littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) gewählt.

Der erste Schritt sollte die Ortung der Metaboliten sein. Es sollte der Verbleib der aufgenommenen Glucosinolate bzw. Hydrolyseprodukte und deren Metabolite geklärt werden. Das heißt, es sollte untersucht werden, ob diese sequestriert oder mit dem Kot ausgeschieden werden. Für diese Untersuchungen wurde auf ein Modellglucosinolat, das Benzylglucosinolat, zurückgegriffen, das in isotope markierter Form hergestellt werden konnte.

Als nächster Schritt sollte unter Verwendung des Modellglucosinolats das Metabolitenmuster bestimmt werden, um Aufschluss über Anzahl und Eigenschaften von Haupt- und Nebenmetaboliten zu erhalten.

Für die abschließende Identifizierung der Metabolite sollte zunächst der Ursprung der Metabolite ermittelt werden. Die Metabolite sollten den möglichen, unterschiedlichen Hydrolyseprodukten und evtl. auch intaktem Glucosinolat zugeordnet werden.

Anschließend sollte die Struktur der Metabolite aufgeklärt werden. Dies sollte Rückschlüsse auf die möglichen Stoffwechselvorgänge und damit auf die Grundsätze der Anpassungsstrategie der Generalisten ermöglichen.

Die beiden ausgewählten Modellorganismen der Gattung Spodoptera sind ausgeprägt polyphag. Sie fressen auf Pflanzen verschiedener Familien und haben keine Präferenz für Brassicaceae, sind auf diesen aber als Schädlinge zu finden. Benzylglucosinolat wurde als Modellglucosinolat gewählt, da es gut aus Pflanzenmaterial isoliert werden kann und stabil ist. Transgene *Arabidopsis thaliana* CYP79A2 akkumulieren Benzylglucosinolat (Wittstock und Halkier, 2000), welches in *A. thaliana* Ökotyp Col-0 nicht enthalten ist. So kann *A. thaliana* CYP79A2 genutzt werden, um isotope markiertes Benzylglucosinolat zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Lepidopteren

Untersucht wurden Larven dreier Arten der Lepidoptera.

- *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae; Bayer CropScience Deutschland GmbH, Deutschland; freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena)
- *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae; Syngenta Crop Protection Münchwilen AG, Schweiz; freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena)
- *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae; Benzon Research Inc., USA)

Alle drei Arten wurden als Eier bezogen. Die Aufzucht erfolgte in einer Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen (25 °C, 56 % Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht und 8 h Dunkelheit). Die Larven wurden bis zum Versuch auf künstlicher Diät auf Bohnenbasis in Kunststoffgefäßen gehalten.

Bohnendiät

500 g Weiße Bohnen, gemahlen (Huber Mühle GmbH, Deutschland)

1 l Leitungswasser

9 g Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

9 g 4-Hydroxybenzoesäuremethylester (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

20 g Vanderzant vitamine mixture for insects (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

4 ml Formaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

Die Komponenten wurden vermischt und in 4 Portionen à ca. 380 g geteilt. Für jede der Portionen wurden 30 g Agar-Agar (Carl Roth GmbH u. Co. KG, Deutschland) und 400 ml Wasser gemischt und in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurde die Bohnenmasse untergerührt und die fertige Diät portionsweise in Platten gegossen. Die Diät wurde bei -20 °C gelagert.

2.1.2 Pflanzen

Die folgenden Spezies bzw. Genotypen kamen zum Einsatz

- *Arabidopsis thaliana*, Columbia-0 (Col-0) (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena)
- *Arabidopsis thaliana* 35S:CYP79A2, Linie 10.1, T5 (Wittstock u. Halkier, 2000) (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena)
- *Arabidopsis thaliana* SALK_072600 (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, England)
- *Tropaeolum majus* Sperling's Scharlachglanz (Samenhaus Knieke, Braunschweig, Deutschland)

A. thaliana-Pflanzen wurden auf einer Erdmischung aus 80% Anzuchterde (Compo GmbH + Co. KG, Deutschland), 10% Sand, 10% Perigran (Knauf Perlite GmbH, Deutschland) sowie einer Düngermischung aus Triabon (Compo GmbH + Co. KG, Deutschland) und Sierrablen (Scotts Deutschland GmbH, Deutschland) laut Herstellerangaben ausgesät und unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer bei 20 °C, 60% Luftfeuchtigkeit und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetisch aktiver Photonenfluxdichte, bei 10 h Licht und 14 h Dunkelheit gezogen.

T. majus-Pflanzen wurden auf Anzuchterde (Compo GmbH + Co. KG, Deutschland) ausgesät und unter den oben genannten Bedingungen gezogen.

2.2 Analytik

2.2.1 Bestimmung der Radioaktivität

^{14}C ist ein schwacher β -Strahler. Da diese Strahlung nicht direkt gemessen werden kann, wird sie unter Verwendung eines Scintillators gemessen, der die radioaktive Strahlung in Photonen überführt. Das Prinzip beruht darauf, dass ein π -Elektron des Scintillators durch den Zerfall des Radionuklids auf ein höheres Energieniveau gehoben wird. Wenn die Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen, emittieren sie Photonen einer bestimmten Wellenlänge, welche detektiert werden können. Als Scintillatoren können Flüssigkeiten (Cocktails), mit denen die Probe gemischt wird, oder fein gemahlene Feststoffe, die von der flüssigen Probe umspült werden, verwendet werden. Verwendet wurden:

- Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500 (Beckman Coulter, Inc. USA)
- Scintillationscocktail: LumaSafe Plus (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. Rodgau-Jügesheim, Deutschland)

Für die Ermittlung der Radioaktivität in flüssigen Proben wurden Aliquots (typischerweise im Bereich von 5 – 100 μl) entnommen und mit 3 ml Scintillationscocktail gemischt. Anschließend wurden sie im Scintillationszähler vermessen. Der Hintergrund wurde durch die Vermessung von Scintillationscocktail ohne Probe bestimmt. Die Messzeit betrug 5 min.

2.2.2 Chromatographische Methoden

Die chromatographische Trennung der Proben erfolgte mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Die Detektion der Analyten wurde online durchgeführt.

HPLC: Agilent 1200 Series; Binary Pump, Vacuum Degaser, Standard Autosampler, Thermostatted Column Compartment (Agilent Technologies Inc., USA)

Säulen:

- Säule 1, Lichrospher 100 RP 18 E, 250 x 4,6 mm, 5,0 µm (WICOM Germany GmbH, Deutschland)
- Säule 2, HyperClone 5µ ODS (C₁₈) 120 A, 150 x 2,0 mm (Phenomenex Inc., Canada)

Detektoren:

- UV-Detektor: Agilent 1200 Variable Wavelength Detector (Agilent Technologies Inc., USA), Detektionswellenlänge: Gradient-1: 229 nm, Gradient-2 und Gradient-3: 245 nm
- Radio-Detektor: RAMONA Star 2" mit Feststoff-Scintillationsmesszelle, Quarztube 5,5 mm, 0,37 ml, Korngröße 45-63 µm (Raytest GmbH, Deutschland)
- Massenspektrometer (MS/MS): Applied Biosystems 3200 Q TRAP, Turbo V Ion Source (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)

Software:

- Gina Star 4.06, für Radio- und UV-Detektion
- Analyst 1.4.2, für Massenspektrometrie

2.2.2.1 Bedingungen für Radio- und UV-HPLC

Für die Radio- und UV-HPLC-Analyse wurden die in Tab. 3 angegebenen Gradienten genutzt. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Als Eluenten wurden 0,1% (Vol/Vol) Trifluoressigsäure (Fließmittel A) und Methanol (Fließmittel B) eingesetzt. Getrennt wurde über Säule 1.

Tab. 3: Fließmittel-Gradienten für Radio- und UV-HPLC

Gradient-1		Gradient-2		Gradient-3	
Zeit [min]	MeOH [%]	Zeit [min]	MeOH [%]	Zeit [min]	MeOH [%]
0	1	0	1	0	1
6	1	2	1	2	1
30	30	62	100	50	40
35	50	64	100	55	100
36	100	65	1	60	100
39	100	70	1	62	1
40	1			65	1
48	1				

2.2.2.2 Bedingungen für HPLC-MS/MS

Die Flußrate der HPLC betrug 300 µl/min. Als Eluenten wurden 0,1 % (Vol/Vol) Ameisensäure (Fließmittel A) und Acetonitril in 0,1 % (Vol/Vol) Ameisensäure (Fließmittel B) eingesetzt. Getrennt wurde über Säule 2. Das Collision Gas war N₂. Die HPLC-Gradienten und MS/MS-Parameter sind in Tabelle 2 bis 7 beschrieben.

Tab. 4: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat

HPLC-Gradient		MS/MS-Parameter		Massen	
Zeit	Acetonitril	Parameter	Einstellung	m/z [M+H⁺]	
[min]	[%]			Q1	Q3
0	1	Polarität	Positiv	457	328
1	1	Curtain gas	35 ml/min	457	179
5	20	Collision gas	High	458	329
20	70	Ion spray voltage	5000 V	458	179
21	99	Temperatur	600 °C		
24	99	Ion Source gas 1	70 ml/min		
25	1	Ion Source gas 2	50 ml/min		
30	1	Declustering potential	45 V		
		Entrance potential	5 V		
		Collision energy	20 V		
		Collision cell exit potential	5 V		

Tab. 5: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für Hippursäure und Phenylacetylglycin

HPLC-Gradient		MS/MS-Parameter		Massen	
Zeit [min]	Acetonitril [%]	Parameter	Einstellung	m/z [M+H ⁺] Q1	Q3
0	6	Polarität	Positiv	180	105
0,5	6	Curtain gas	20 ml/min	181	106
2,5	27	Collision gas	Medium	194	91
9	60	Ion spray voltage	5500 V	195	92
9,5	99	Temperatur	580 °C		
10,5	99	Ion Source gas 1	45 ml/min		
11	5	Ion Source gas 2	50 ml/min		
16	5	Declustering potential	25 V		
		Entrance potential	7,6 V		
		Collision energy	27 V		
		Collision cell exit potential	4 V		

Tab. 6: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für Benzylglucosinolat

HPLC-Gradient		MS/MS-Parameter		Massen	
Zeit [min]	Acetonitril [%]	Parameter	Einstellung	m/z [M+H ⁺] Q1	Q3
0	1	Polarität	Negativ	408	97
1	1	Curtain gas	40 ml/min	409	97
15	30	Collision gas	Medium		
18	50	Ion spray voltage	-4000 V		
19	99	Temperatur	500 °C		
22	99	Ion Source gas 1	40 ml/min		
23	1	Ion Source gas 2	40 ml/min		
30	1	Declustering potential	-55 V		
		Entrance potential	-5 V		
		Collision energy	-40 V		
		Collision cell exit potential	-6 V		

Tab. 7: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat

HPLC-Gradient Zeit [min]	Acetonitril [%]	MS/MS-Parameter		Massen m/z [M+H ⁺]	
		Parameter	Einstellung	Q1	Q3
0	1	Polarität	Positiv	485	356
2	1	Curtain gas	35 ml/min	485	308
3	20	Collision gas	High	485	136
10	60	Ion spray voltage	5500 V		
11	100	Temperatur	400 °C		
12	100	Ion Source gas 1	50 ml/min		
13	1	Ion Source gas 2	55 ml/min		
18	1	Declustering potential	45 V		
		Entrance potential	5 V		
		Collision energy	25 V		
		Collision cell exit potential	4 V		

Tab. 8: HPLC-Gradient und MS/MS-Parameter für den Precursor Ion Scan

HPLC-Gradient Zeit [min]	Acetonitril [%]	MS/MS-Parameter	
		Parameter	Einstellung
0	1	Polarität	Positiv
1	1	Curtain gas	25 ml/min
15	30	Collision gas	High
18	50	Ion spray voltage	5000 V
19	99	Temperatur	430 °C
22	99	Ion Source gas 1	40 V
23	1	Ion Source gas 2	70 V
30	1	Declustering potential	10 V
		Entrance potential	8 V
		Collision energy	40 V
		Collision cell exit potential	5 V

Tab. 9: HPLC-Gradient, MS/MS-Parameter, Massen und Fragmente der MRM-Methode für die durch Precursor Ion Scan ermittelte Masse 346 m/z $[M+H]^+$

HPLC-Gradient		MS/MS-Parameter		Massen	
Zeit [min]	Acetonitril [%]	Parameter	Einstellung	m/z $[M+H]^+$ Q1	Q3
0	1	Polarität	Positiv	346	184
1	1	Curtain gas	35 ml/min	346	91
3	30	Collision gas	High	347	185
13	55	Ion spray voltage	5000 V	347	92
14	99	Temperatur	600 °C		
16	99	Ion Source gas 1	70 ml/min		
17	1	Ion Source gas 2	50 ml/min		
22	1	Declustering potential	25 V		
		Entrance potential	5 V		
		Collision energy	25 V		
		Collision cell exit potential	5 V		

2.2.3 Hochauflösende Massenspektrometrie

Die Hochauflösende Massenspektrometrie (MS) wurde freundlicher Weise am Institut für organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

Um die exakte Masse von Analyten unbekannter Struktur zu ermitteln, wurde eine hochauflösende Massenspektrometrie durchgeführt. Verwendet wurde eine LTQ-Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland), eine Linear-Iontrap gekoppelt mit einem Orbitrap als Massenanalysator.

Die Konzentration des Analyten wurde so eingestellt, dass sie ca. 50 µg/ml betrug, Lösemittel war Methanol. Die Probe enthielt 0,1 mg/ml Tetradecyltrimethylammoniumbromid als interne Massenreferenz (vermessen als Kation, 256,29988 amu). Die Probe wurde mit 1 µl/min direkt eingespritzt. Ionen wurden über Elektrospray Ionisierung (ESI) erzeugt.

2.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Analysen wurden freundlicher Weise im NMR-Labor der Chemischen Institute, TU Braunschweig durchgeführt.

Die Strukturen der synthetisierten Metabolite (*N*-Benzylmalonaminsäure und *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid) wurden mittels 1D und 2D ¹H- und ¹³C-NMR bestätigt. Das verwendete Gerät war ein Bruker Avance II 600 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany). Durchgeführt wurden folgende Analysen: DEPT-135, H,C-HSQC und H,C-HMBC. Als Lösemittel wurde deuteriertes Methanol (CD₃OD) verwendet, welches auch als Referenz für den chemischen Shift (δ_C = 49,02 ppm) für die ¹³C-NMR-Analysen diente. Als Referenz für die ¹H-NMR-Analysen diente Tetramethylsilan (δ_H = 0,00 ppm).

2.3 Synthesen

2.3.1 Präparation isotopenmarkierter Substrate

2.3.1.1 ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat, [1,2,1',2',3',4',5',6'- ^{14}C]Benzylglucosinolat

Organismen und Radiochemikalien

- *A. thaliana* 35S:CYP79A2, Rosettenblätter
- L-[U- ^{14}C]Phenylalanin, spezifische Aktivität 17 GBq/mmol, radioaktive Konzentration 1,85 MBq/ml (Amersham Biosciences, England)



Abb. 3: Versuchsaufbau zur Präparation von ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat. Blätter von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 nehmen durch ihre Blattstiele L-[U- ^{14}C]Phenylalanin auf. Nach Verbrauch der Lösung wird mit Wasser weitere 12 h inkubiert. Anschließend erfolgt die Isolation des Benzylglucosinolats.

Verwendet wurden Rosettenblätter von acht bis neun Wochen alten *A. thaliana* 35S:CYP79A2 mit einer Größe von 80-100 mg pro Blatt. Die Größe der Ansätze umfaßte 20-50 Blätter. Pro Blatt wurden 20 μl L-[U- ^{14}C]Phenylalanin in ein Well einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert. In jedes Well wurden dann jeweils zwei abgeschnittene Blätter gesetzt [Abb. 3]. Nach 3 - 4 h war der Großteil des L-[U- ^{14}C]Phenylalanins aufgenommen. Anschließend wurde für eine möglichst quantitative Aufnahme der Radioaktivität pro Well einmal mit 50 μl Leitungswasser nachinkubiert. Wenn dieses

fast vollständig aufgenommen war, erfolgte die weitere Inkubation der Blätter mit ausreichend Leitungswasser für weitere 12 h.

Alle Blätter eines Ansatzes wurden zusammen mit konzentriertem Methanol extrahiert. Die erste Extraktion wurde mit 5-12,5 ml (250 µl/Blatt) durchgeführt, die zweite und dritte Extraktion mit jeweils 2,5-6,25 ml (125 µl/Blatt). Durch das größere Methanolvolumen der ersten Extraktion wurde eine möglichst vollständige Hemmung der Myrosinase bezweckt. Die Vollständigkeit der Extraktion wurde mittels Scintillationszähler verfolgt.

Die vereinigten methanolischen Extrakte wurden unter Pressluft (Sample Concentrator) zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit 5-12,5 ml Wasser extrahiert und der Extrakt zur Entfernung von Chlorophyll und lipophilen Bestandteilen mit Dichlormethan gereinigt.

Die weitere Aufreinigung des ^{14}C -markierten Benzylglucosinolats erfolgte über Anionenaustauschchromatographie mittels DEAE Sephadex A25 (Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland). Verwendet wurden 2 ml einer vorgequollenen Suspension von 200 mg DEAE Sephadex A25 in 2 ml Wasser. Die Glucosinolate binden über die Sulfat-Gruppe an die Matrix. Stärker saure Substanzen wurden mit 6 ml einer Mischung aus Wasser/Isopropanol/Ameisensäure im Verhältnis 5:2:3 (Vol/Vol/Vol) von der Säule gewaschen. Anschließend wurde bis zu einem neutralem pH-Wert mit Wasser nachgespült. Eluiert wurde mit 8 ml 0,5 M Kaliumsulfatlösung/ 3 % Isopropanol (Vol/Vol) in vorgelegte 8 ml Ethanol. Die sehr geringe Löslichkeit von Kaliumsulfat in Ethanol konnte hier zur Abtrennung überschüssigen Kaliumsulfats genutzt werden. Eine möglichst quantitative Entfernung sollte erreicht werden, da sich Kaliumsulfat als salinisches Laxans negativ auf die Fraßversuche auswirkte. Desweiteren ist Sulfat ein Inhibitor der Myrosinase, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse von Fraßtests führen könnte. Kalium wirkt sich in größeren Mengen negativ auf die Versuchspflanzen aus. Nach Abzentrifugieren von ausgefallenem Kaliumsulfat wurde der Überstand zur Trockne eingengt und erneut in 8 ml Methanol aufgenommen, auf 4 ml eingengt und mit 4 ml Ethanol versetzt, das nun ausgefallene Kaliumsulfat wurde abzentrifugiert. Vor dem erneuten Einengen wurde die Radioaktivität des Überstandes bestimmt. Abschließend konnte das Glucosinolat in einer ausreichenden Menge Wasser aufgenommen werden, um die gewünschte Anzahl an cpm/µl zu erhalten. Die fertige Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

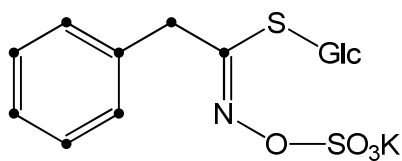


Abb. 4: Strukturformel mit ^{14}C -Atomen des [1,2,1',2',3',4',5',6'- ^{14}C]Benzyglucosinolat, schwarze Punkte entsprechen ^{14}C -Atomen. L-[U- ^{14}C]Phenylalanin wurde von *A. thaliana* 35S:CYP79A2-Blättern, welche kontinuierlich Benzyglucosinolat produzieren, aufgenommen und während der Glucosinolatbiosynthese als aromatischer Rest eingebaut.

Zur Bestätigung der radiochemischen Reinheit erfolgte die Vermessung mittels HPLC mit Radiodetektor, Gradient 1, Tab. 3 bzw. [2.2.2].

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität in Bq/ μmol wurde das Benzyglucosinolat in der erhaltenen Präparation quantitativ bestimmt. Dazu wurde die Präparation auf der HPLC mit Radio- und UV-Detektor analysiert (Detektionswellenlänge 229 nm). Die Kalibration erfolgte mit Hilfe einer bekannten Menge unmarkierten Benzyglucosinolats. Die Bestimmung der Radioaktivität der ^{14}C -markierten Präparation wurde am Scintillationszähler vorgenommen.

Erhalten wurden radiochemisch reine Substanzen mit den in Tab. 10 angegebenen spezifischen Aktivitäten.

Die Präparationen wurden als radioaktive Tracer in Fraßversuchen eingesetzt.

Tab. 10: Übersicht über die verwendeten Präparationen (Tracer) von ^{14}C -markiertem Benzyglucosinolat

Präparation	Spez. Aktivität	Ausbeute	Abkürzung
070313	24 kBq/ μmol	5,2%, 112 kBq	^{14}C -BenzGI-1
070808	8 kBq/ μmol	5,6%, 61 kBq	^{14}C -BenzGI-2
080403	32 kBq/ μmol	7,2%, 187 kBq	^{14}C -BenzGI-3
080429	24 kBq/ μmol	7,7%, 125 kBq	^{14}C -BenzGI-4
081020	31 kBq/ μmol	6,8%, 110 kBq	^{14}C -BenzGI-5
090405	48 kBq/ μmol	8,2%, 120 kBq	^{14}C -BenzGI-6

2.3.1.2 ^{13}C -markiertes Benzylglucosinolat, $[1-^{13}\text{C}]$ Benzylglucosinolat

Organismen und isotoopenmarkierte Chemikalien

- *A. thaliana* 35S:CYP79A2, Rosettenblätter
- L-[3- ^{13}C]Phenylalanin, 99% (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA)

Die Präparation erfolgte analog der Synthese des ^{14}C -markierten Benzylglucosinolats, jedoch ausgehend von L-[3- ^{13}C]Phenylalanin. Das ^{13}C -markierte Phenylalanin wurde in einer Lösung von 0,2 mg L-[3- ^{13}C]Phenylalanin in 1 ml 4% (Vol/Vol) Ethanol eingesetzt.

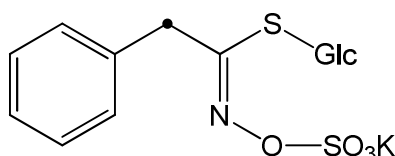


Abb. 5: Struktur mit ^{13}C -Atom des $[1-^{13}\text{C}]$ Benzylglucosinolat, schwarzer Punkt entspricht dem ^{13}C -Atom. L-[3- ^{13}C]Phenylalanin wurde von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 Blättern, welche Benzylglucosinolat kontinuierlich produzieren, aufgenommen und während der Glucosinolatbiosynthese als aromatischer Rest eingebaut.

Das in der Präparation enthaltene Benzylglucosinolat wurde über HPLC mit UV-Detektor bei 229 nm quantifiziert. Verwendet wurde die unter [2.2.2] aufgeführte HPLC mit dem in Tabelle 3 angegebenen HPLC-Gradienten-1. Anschließend wurde die prozentuale Markierung mittels HPLC-MS/MS mit den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen und Parametern bestimmt. Der Markierungsgrad ist der prozentuale Anteil an Benzylglucosinolatmolekülen, die ein ^{13}C -Atom enthalten, von der Gesamtzahl an Benzylglucosinolatmolekülen. Die für die verwendeten Präparationen erhaltenen Markierungsgrade sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Präparationen von ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat

Präparation	Markierungsgrad	Abkürzung
080517	37%	^{13}C -BenzGl-1
090417	41%	^{13}C -BenzGl-2

2.3.2 Synthese chemischer Standards für die Strukturaufklärung

2.3.2.1 Synthese von *N*-Benzylmalonaminsäure

Die Standardsubstanz für die Strukturaufklärung, 3-(Benzylamino)-3-oxopropansäure, wird im Weiteren als *N*-Benzylmalonaminsäure bezeichnet. Die Synthese der *N*-Benzylmalonaminsäure erfolgte über die Vorstufe Ethyl-*N*-benzylmalonamat (Moyer et al, 1985). Hierfür wurden 2,5 mmol Benzylamin in 10 ml Dichlormethan vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 2,5 mmol Methylmalonylchlorid in 10 ml Dichlormethan zugetropft. Nach 2 Stunden Rühren wurde die Reaktion mit weiteren 30 ml Dichlormethan verdünnt und anschließend mit 50 ml 1 M Phosphorsäure, 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die gereinigte Dichlormethanphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt.

In den folgenden Schritten wurde die Schutzgruppe entfernt und das Endprodukt, die *N*-Benzylmalonaminsäure, gereinigt (Cabaret et al, 2003). Zur Hydrolyse der Esterbindung wurde die Vorstufe in 5 ml 1 M Natronlauge und 5 ml Ethanol über Nacht gerührt. Nicht umgesetztes Ethyl-*N*-benzylmalonamat wurde durch Ausschütteln mit Ethylacetat entfernt. Anschließend wurde mit 50 %iger Salzsäure angesäuert und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt.

Die Reinigung der *N*-Benzylmalonaminsäure erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Aceton/Ameisensäure im Verhältnis 99:1. Die Struktur der Synthese [Abb. 6] wurde mittels NMR bestätigt (siehe Anhang).

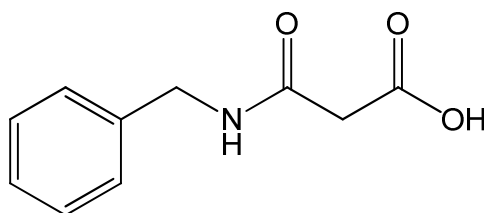


Abb. 6 : Struktur der *N*-Benzylmalonaminsäure

2.3.2.2 Synthese von *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid

Die Synthese des 3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl-benzyl-carbamodithioat, im weiteren bezeichnet als *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid, erfolgte modifiziert nach Rieche et al. (1963). Unter Rühren und Eiswasserkühlung wurde eine Lösung von 1 mmol Benzylamin in 5 ml *N,N*-Dimethylformamid mit 0,1 ml einer 40 %igen Lösung von Natriumhydroxid versetzt. Ebenfalls unter Rühren und Eiswasserkühlung erfolgte die tropfenweise Zugabe von 1 mmol Schwefelkohlenstoff in 5 ml *N,N*-Dimethylformamid. Nach 2 h war eine Farbvertiefung von gelb zu rot-orange zu beobachten. Unter gleichen Bedingungen wurde dem Reaktionsansatz eine Lösung von 1 mmol 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*D*-glucopyranosylbromid in 5 ml *N,N*-Dimethylformamid tropfenweise zugegeben. Nach 12 h wurde die Reaktion durch Gießen auf 50 g Eis gestoppt. Nach dem Schmelzen wurde drei Mal mit 20 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Dies erfolgte in zwei Schritten, zunächst wurde das Dichlormethan bei 40 °C und 800 mbar abgezogen und anschließend *N,N*-Dimethylformamid bei 45 °C und 20 mbar. Die Reinigung des Zwischenproduktes *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-tetraacetyl-*D*-glucopyranosid erfolgte über Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Diethylether im Verhältnis 9:1.

Das gereinigte Zwischenprodukt wurde zur Abspaltung der Acetat-Schutzgruppen einer sauren Hydrolyse unterworfen. Dazu wurde die Substanz in 5 ml Ethanol gelöst, mit 1 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Substanz unter Pressluft zur Trockne eingeeengt, in 5 ml 10 % (Vol/Vol) Methanol aufgenommen und über CHROMABOND® C18 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) gereinigt. Hierfür wurde nach dem Auftragen der Probe mit Wasser und 20 % (Vol/Vol) Methanol gewaschen und 60 % (Vol/Vol) Methanol eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Struktur der Synthese [Abb. 7] wurde mittels NMR bestätigt (siehe Anhang).

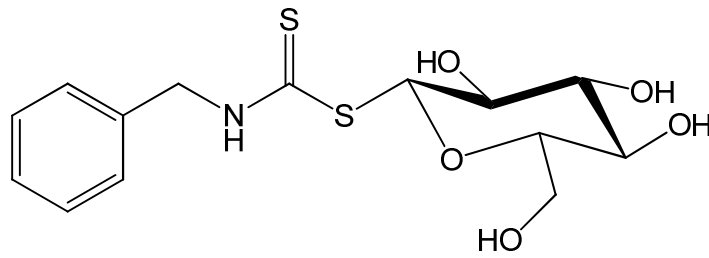


Abb. 7 : Struktur des *N*-Benzylthiocarbamidsäure- β -D-glucosid

2.3.2.3 Synthese weiterer Standards

Benzylglucosinolat

Benzylglucosinolat wurde als Kaliumsalz aus Samen von *Sinapis alba* (Samenhaus Knieke, Braunschweig, Deutschland) isoliert (Thies, 1988).

Glutathionkonjugate von Isothiocyanaten

Glutathionkonjugate wurden wie in (Kassahun et al., 1997) beschrieben synthetisiert. 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat wurde am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat wurde abweichend mit Benzylisothiocyanat (Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) hergestellt.

2.4 Fütterungsversuche mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat

2.4.1 Versuchsaufbau, Probennahme und Extraktion

Präparation von ^{14}C -markiertem Blattmaterial

Blattmaterial wurde direkt vor dem Versuch präpariert. Hierfür wurden abgeschnittene Blätter der jeweiligen Versuchspflanze verwendet. Um das Austrocknen der Blätter während des Versuches zu verhindern, wurden die Stiele in Gefäße geeigneter Größe mit Leitungswasser gestellt. Dies waren bei den verschiedenen *A. thaliana*-Pflanzen die mit Parafilm abgedeckten Vertiefungen von PCR-Platten aus Kunststoff, die auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten waren und bei *T. majus*-Pflanzen 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit durchstochenem Deckel für den Stiel. ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat wurde entweder durch Aufpipettieren auf die Blätter aufgebracht oder gelangte durch Aufsaugen über die Blattstiele in die Blätter. Für das Aufpipettieren wurde das ^{14}C -markierte Benzylglucosinolat im Verhältnis 1:3 (Vol/Vol) mit Ethanol gemischt, in kleinen Tröpfchen gleichmäßig auf das Blatt aufpipettiert und anschließend bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Zum Aufsaugen wurden die Blattstiele in das ^{14}C -markierte Benzylglucosinolat getaucht. Nach vollständiger Aufnahme wurde 3 h mit Leitungswasser nachinkubiert. Anschließend wurden die Blätter in die oben beschriebenen Gefäße mit Leitungswasser überführt und an die Raupen verfüttert.

Fütterung des ^{14}C -markierten Materials an Raupen

Die Fraßversuche wurden mit Raupen der drei verschiedenen Spezies im fünften Larvenstadium durchgeführt. Vor dem Versuchsstart wurden die Raupen ausgeeinzelt und verblieben 12 h ohne Nahrung. Anschließend wurden ihnen die mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat präparierten Blätter angeboten. Hierzu wurden die Raupen einzeln unter Kunststoffgefäßen geeigneter Größe auf Petrischalen gehalten [Abb. 8]. Dieser Versuchsaufbau war nötig, da die Raupen unter den Laborbedingungen zu Kannibalismus neigen können.

Der Kot wurde tagsüber stündlich gesammelt und, soweit nicht anders beschrieben, bei -20 °C bis zur Extraktion gelagert.



Abb. 8: Aufbau eines Fütterungsversuchs mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat. *A. thaliana* Col-0 Blätter nahmen ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat über die Blattstiele auf und wurden nach der Aufnahme 3 h mit Wasser nachinkubiert. Für den Fraßversuch wurden ^{14}C -markiertes *A. thaliana* Blätter in eine zurechtgeschnittene PCR-Platte überführt und an *S. exigua* verfüttert. Ausgeschiedener Kot wird extrahiert und auf Metabolite untersucht.

Kotextraktion

Soweit in den Einzelversuchen nicht anders beschrieben, wurde der Kot wie folgt extrahiert:

Als Extraktionsmittel wurden Wasser oder 100 mM Citratpuffer, pH 3,5 eingesetzt. Es wurde drei Mal mit 1 ml Extraktionsmittel extrahiert, hierfür wurde der Kot im Extraktionsmittel mit einem Minipistill verrieben und anschließend bei 12000 *g* und 5 °C zentrifugiert. Die Vollständigkeit der Extraktion konnte mittels Scintillationszähler verfolgt werden. Die vereinigten Rohextrakte wurden drei Mal mit 1 ml Dichlormethan zur Entfernung von lipophilen Bestandteilen ausgeschüttelt. In der gereinigten wässrigen Phase wurde die Radioaktivität ermittelt. Die wässrige Phase wurde zur Trockne eingeeengt. Anschließend wurde der Rückstand in einer entsprechenden Menge Wasser wieder aufgenommen. In der Regel konnte der Rückstand nicht komplett aufgelöst werden, unlösliche Bestandteile wurden deshalb durch 45 min Zentrifugation mit 20000 *g* abgetrennt. Der resultierende Überstand wurde als HPLC-Probe für die weitere Analyse verwendet.

2.4.2 Optimierung der Fütterungsversuche

Stabilität des Tracers

Organismen und Tracer

- Pflanzen: *A. thaliana* Col-0
- ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat: ^{14}C -BenzGI-3

Auf fünf *A. thaliana*-Blätter wurde ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat aufpipettiert, fünf Blätter nahmen es über den Blattstiel auf [2.4.1]. Die eingesetzte Radioaktivität betrug 28000 cpm pro Blatt. Nach 1 h, 2 h und 3 h wurden die Blätter in je 500 μl Methanol extrahiert, nach 21 h zwei Blätter (jeweils in 500 μl Methanol). Die Extrakte wurden zur Trockne eingeeengt in 100 μl Wasser aufgenommen und mit 100 μl Dichlormethan ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden am Scintillationszähler und mittels HPLC mit Radiodetektor vermessen, HPLC-Gradient-1 [Tab. 3].

Einfluß der Applikationsmethode auf das Metabolitenmuster im Kot

Organismen und Tracer

- Lepidopteren: *S. exigua*
- Pflanzen: *A. thaliana* Col-0
- ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat: ^{14}C -BenzGI-3

Es wurden zwei Gruppen mit jeweils sechs Raupen über vier Tage mit ^{14}C -markierten Blättern gefüttert. Eine Gruppe erhielt Blätter, auf die das ^{14}C -markierte Benzylglucosinolat aufpipettiert wurde, die andere Blätter, die es über die Blattstiele aufgenommen hatten [2.4.1]. Am fünften Tag erhielten die Raupen unmarkierte Blätter. Die jeweils eingesetzte Menge an Radioaktivität betrug 1736000 cpm. Markierte Blätter wurden tagsüber gefüttert. Um einen Hungerzustand in der Nacht zu vermeiden wurden nachts unmarkierte Blätter zugefüttert. Die Zeiträume, in denen nachts nicht gesammelt wurde, betrugen 6 bis 8 h. Jahreszeitlich bedingt kam es dazu, dass Kot antrocknete, dieser Kot wurde trotzdem gesammelt.

Der über den gesamten Zeitraum gesammelte Kot wurde mit Wasser extrahiert [2.4.1]. Das Endvolumen der Kotextrakte betrug 200 µl. Die Extrakte wurden am Scintillationszähler und der HPLC mit Radiodetektor, Gradient-3 [Tab.3] vermessen.

Abhängigkeit des Metabolitenmusters von der Dauer des Fütterungsversuchs

Organismen und Tracer

- Lepidopteren: *S. exigua*
- Pflanzen: *A. thaliana* Col-0
- ¹⁴C-markiertes Benzylglucosinolat: 14C-BenzGI-2

Zehn Raupen wurden fünf Tage mit ¹⁴C-markierten Blättern gefüttert, die durch Aufpipettieren präpariert worden waren [2.4.1]. Es wurde eine Radioaktivität von 964000 cpm eingesetzt. Nachts wurden unmarkierte Blätter zugefüttert. Die Zeit, in der nachts nicht stündlich gesammelt wurde, betrug 6 bis 8 h. Am sechsten Tag wurde mit unmarkierten Blättern nachgefüttert. Kot wurde in 24-h-Zeiträumen gesammelt. Der erste Zeitraum begann am Abend des ersten Fütterungstages, da zu diesem Zeitpunkt erstmals Radioaktivität ausgeschieden wurde. Zwei Raupen starben am ersten und zwei am zweiten Versuchstag. Der Versuch wurde mit den verbliebenen Tieren fortgeführt.

Die Kotproben wurden abweichend von [2.4.1] jeweils einmal mit 500 µl Wasser und anschließend zweimal mit 200 µl Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Extrakte der einzelnen Proben wurden dreimal mit 500 µl Dichlormethan gereinigt. Nach dem Einengen der wässrigen Phasen zur Trockne wurden die Proben in 120 µl Wasser aufgenommen.

Die Proben wurden am Scintillationszähler und an der HPLC mit Radiodetektor vermessen, Gradient-3 [Tab.3].

Untersuchung weiterer Einflussfaktoren

In ähnlichen Versuchen wie oben beschrieben, wurden die Einflüsse weiterer Parameter auf das Metabolitenmuster untersucht.

- Verschiedene Extraktionsmittel; getestet wurden Wasser, Methanol und 100 mM Citratpuffer, pH 3,5.
- Verschiedene Lagerungsbedingungen des gesammelten Kots; getestet wurde die Lagerung bei -20 °C und in vorgelegtem 100 mM Citratpuffer, pH 3,5 bei 4 °C.
- Enzymatische Reaktionen während der Kotalaufarbeitung; eine vor der Extraktion denaturierte Probe (5 min auf 95 °C erhitzt) wurde mit einer nativen Probe verglichen.

2.4.3 Vergleich des Metabolismus in *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni*

Organismen und Tracer

- Lepidopteren: *S. exigua*, *S. littoralis*, *T. ni*
- Pflanzen: *A. thaliana* Col-0
- ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat: ^{14}C -BenzGI-1
- Fütterungsdauer: 24 h

Der Versuchsaufbau entsprach dem unter [2.4.1] beschriebenen Aufbau. Es wurden zehn Raupen von *S. exigua*, sieben Raupen von *S. littoralis* und zehn Raupen von *T. ni* eingesetzt. Die Fütterungsdauer betrug 24 h. Das Blattmaterial wurde durch Aufsaugen des Tracers über die Blattstiele markiert. Die Zeit, in der nicht stündlich Kot gesammelt wurde, betrug 7 h. Jahreszeitbedingt trocknete der Kot in dieser Zeit zum Teil an. Um festzustellen, ob die Raupen Radioaktivität speichern, wurden sie nach dem Versuch hydrolysiert und das Hydrolysat am Scintillationszähler vermessen. Für die Hydrolyseansätze wurden pro Raupe 1 ml SolvableTM (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. Rodgau-Jügesheim, Deutschland) und 200 µl Wasser in ein fest verschließbares Reaktionsgefäß aus Glas gegeben. In diesem Ansatz wurden die Raupen 72 h im Trockenschrank bei 60 °C hydrolysiert.

Um die gesamte Menge an lipophilen Ausscheidungsprodukten zu erfassen, wurde der Kot drei Mal mit 1 ml Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethanextrakte wurden am Scintillationszähler vermessen.

Der Rückstand wurde mit Wasser nach [2.4.1] extrahiert, wie dort beschrieben mit Dichlormethan gereinigt und anschließend an der HPLC mit Radiodetektor, Gradient-2 [Tab.3], sowie am Scintillationszähler vermessen.

Um den Versuch in Bezug auf die eingesetzte Radioaktivität quantifizieren zu können, wurde die von den Blättern nicht aufgenommene Radioaktivität, sowie die Radioaktivität in nicht gefressenem Blattmaterial bestimmt. Zur Bestimmung der Radioaktivität in nicht gefressenem Blattmaterial wurden die Blätter mit Methanol extrahiert und die Extrakte am Scintillationszähler vermessen [Tab. 12].

Tab. 12: Eingesetzte und von Raupen aufgenommene Radioaktivität in Fütterungsversuchen mit *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni*. Prozentuale Angaben beziehen sich auf die eingesetzte Radioaktivität (Zeile 1) und *A. thaliana*-Blätter, die ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat durch die Blattstiele aufgenommen hatten.

	<i>S. exigua</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>T. ni</i>
Gesamt eingesetzte Radioaktivität [cpm]	210600	491400	448937
Davon nicht durch Blätter aufgenommen [%]	23	14	1
Davon in nicht gefressenen Blättern [%]	10	7	64
von den Raupen aufgenommene Radioaktivität (berechneter Wert) [cpm]	141102	388206	291809

Auswertung

Durch die am Scintillationszähler ermittelten Werte wurde die Wiederfindungsrate an Radioaktivität in Raupenkörper und Kot, bezogen auf die von den Raupen aufgenommene Radioaktivität, und die prozentuale Verteilung der Aktivität in Raupenkörper, organischem Kotextrakt und wässrigem Kotextrakt ermittelt.

Die wässrigen Kotextrakte wurden an der HPLC mit Radiodetektor analysiert, Gradient-2 [Tab.3].

2.4.4 Untersuchungen zur Zuordnung der Metabolite

Organismen und Tracer

- Lepidopteren: *S. exigua* und *S. littoralis*
- Pflanzen/Substrat: Bohnendiät, *T. majus*, *A. thaliana* SALK_072600, *A. thaliana* Col-0
- ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat: ^{14}C -BenzGI-3 bis ^{14}C -BenzGI-6

Eine Zuordnung der Peaks zu Metaboliten von intaktem Benzylglucosinolat, Benzylisothiocyanat oder Phenylacetonitril wurde durch die Fütterung von ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat auf unterschiedlichen Substraten und anschließende Kotanalyse vorgenommen [Tab.13]. Eine Untersuchung auf die Metabolisierung von intaktem Glucosinolat erfolgte durch die Fütterung von Bohnendiät mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat. *T. majus* und *A. thaliana* SALK_072600 bilden bei Gewebeverletzung nur Isothiocyanate. *A. thaliana* Col-0 bildet bei Gewebeverletzung vorwiegend Isothiocyanate, aber auch einfache Nitrile.

Es wurden pro Versuch 10 Raupen eingesetzt. Die Versuche wurden wie unter [2.4.1] durchgeführt. Das ^{14}C -markierte Benzylglucosinolat wurde auf das entsprechende Substrat aufpipettiert. Für die Versuche mit ^{14}C -markierter Diät wurde Bohnendiät in 100 mg Portionen geschnitten und das ^{14}C -markierte Benzylglucosinolat wurde unverdünnt aufgetragen, wobei es gleichmäßig in die Diät einzog. Als Extraktionsmittel für den Kot wurde 100 mM Citratpuffer, pH 7,5, verwendet.

Die Kotextrakte wurden an der HPLC mit Radiodetektor vermessen, Gradient-3 [Tab.3].

Tab. 13: Übersicht über die Fütterungsversuche zur Zuordnung der Metabolite zur Umsetzung von intaktem Benzylglucosinolat, Benzylisothiocyanat oder Phenylacetonitril in den Raupen. Das jeweilige Substrat wurde mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat versetzt und an Raupen von *S. exigua* und *S. littoralis* verfüttert. Versuche mit *A. thaliana* SALK_072600 wurden nur mit *S. littoralis* durchgeführt.

Gesuchte Metabolite	Substrat	Tracer <i>S. exigua</i>	Tracer <i>S. littoralis</i>
Metabolite von Benzylglucosinolat	Bohnendiät	^{14}C -BenzGl-3	^{14}C -BenzGl-6
Metabolite von Benzylisothiocyanat	<i>T. majus</i>	^{14}C -BenzGl-4	^{14}C -BenzGl-6
	<i>A. thaliana</i> SALK_072600	-	^{14}C -BenzGl-6
Metabolite der Gesamten Hydrolyseprodukte	<i>A. thaliana</i> Col-0	^{14}C -BenzGl-5 u. 6	^{14}C -BenzGl-5 u. 6

2.5 Versuche zur Strukturaufklärung

2.5.1 Fütterungsversuche zur Strukturaufklärung

Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat

Die Versuche folgten im Aufbau den Fütterungsversuchen mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat [2.4.1]. Das ^{13}C -markierte Benzylglucosinolat wurde nur auf die Blätter aufpipettiert. Pro Blatt wurden 20 μl einer ethanolischen 1:3 Verdünnung des ^{13}C -markierten Benzylglucosinolats eingesetzt. Die Anzahl der Raupen betrug 10 bis 15 Tiere. Es wurden so lange Blätter gefüttert, bis eine Kotmenge von 400 bis 500 mg erreicht war. Die Kotextraktion erfolgte ebenfalls analog [2.4.1]. Eingesetzte Extrakte wurden abschließend in einem Volumen von 500 μl Wasser aufgenommen.

Fütterungsversuche mit unmarkiertem Benzylglucosinolat

Proben mit unmarkierten Metaboliten wurden erhalten, indem *T. majus* und *A. thaliana* 35S:CYP79A2 verfüttert wurden. Zusätzlich wurden ebenfalls *A. thaliana* Col-0 und *A. thaliana* SALK_072600 mit aufpipettiertem unmarkiertem Benzylglucosinolat gefüttert. Die aufpipettierte Menge betrug dabei 50 nmol pro Blatt. Die Anzahl der Raupen betrug 10 bis 15 Tiere. Es wurden Blätter verfüttert, bis 400 bis 500 mg Kot erhalten wurden. Dieser wurde nach [2.4.1] extrahiert. Das Endvolumen der Proben betrug 500 µl.

Zusätzlich wurden Blindproben angefertigt. Hierzu wurden den Raupen Blätter von *A. thaliana* Col-0 und *A. thaliana* SALK_072600 verfüttert. Beide Pflanzen produzieren kein Benzylglucosinolat. Die Fütterung der Raupen sowie die Kotextraktion wurden wie bei den oben genannten Fütterungen durchgeführt.

Tab. 14: Übersicht über die Fütterungsversuche zur Strukturaufklärung. An *S. exigua* und *S. littoralis* wurden Blätter mit aufgetragenem ¹³C-markiertem und unmarkiertem Benzylglucosinolat, sowie Blätter von Pflanzen die Benzylglucosinolat endogen enthalten und solche ohne verfüttert. Die Pflanzen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Hydrolyseprodukte. Die Blätter wurden an *S. exigua* und *S. littoralis* verfüttert. Versuche mit *A. thaliana* SALK_072600 wurden nur mit *S. littoralis* durchgeführt.

Benzylglucosinolat	Pflanze	<i>S. exigua</i>	<i>S. littoralis</i>
¹³ C-markiert, aufpipettiert	<i>A. thaliana</i> Col-0	+	+
	<i>A. thaliana</i> SALK_072600	-	+
Unmarkiert, aufpipettiert	<i>A. thaliana</i> Col-0	+	+
	<i>A. thaliana</i> SALK_072600	-	+
endogen	<i>T. majus</i>	+	+
	<i>A. thaliana</i> 35S:CYP79A2	+	+
nicht enthalten	<i>A. thaliana</i> Col-0	+	+
	<i>A. thaliana</i> SALK_072600	-	+

Die erhaltenen Kotextrakte wurden entweder 1:100 (Vol/Vol) mit 50% (Vol/Vol) Methanol, 0,1 % (Vol/Vol) Ameisensäure verdünnt und an der HPLC-MS/MS vermessen oder für die weitere Analytik nach [2.5.2] fraktioniert.

Eine Übersicht der zur Strukturaufklärung durchgeführten Fraßversuche gibt Tabelle 14.

2.5.2 Fraktionierung von Kotproben

- Fraktionssammler: Foxy Jr. (Teledyne ISCO, Inc., USA)
- HPLC siehe [2.2.2]
- HPLC-Gradient-3 [Tab.3]

Für die gezielte Suche nach Metaboliten wurden ^{13}C -markierte und unmarkierte Kotproben am Fraktionssammler fraktioniert, um die einzelnen Metabolite präparativ zu trennen. Hierfür wurden 100 μl der unter [2.5.1] erhaltenen Proben in die HPLC injiziert. Fraktioniert wurde in Schritten von 1 ml. Um die Fraktionen, die Metabolite enthielten zu ermitteln, wurden auf gleiche Weise erhaltene ^{14}C -markierte Proben fraktioniert. In den erhaltenen Fraktionen wurde die Radioaktivität bestimmt. Die jeweils zu den radioaktiven Fraktionen analogen Fraktionen aus ^{13}C -markierten und unmarkierten Proben wurden für die weitere Untersuchung eingesetzt. Proben für HPLC-MS/MS-Analysen (QTrap) wurden 1:10 (Vol/Vol) mit 50 % (Vol/Vol) Methanol, 0,1 % (Vol/Vol) Ameisensäure verdünnt. Für die hochauflösende HPLC-MS wurden drei gleiche Fraktionen gesammelt, zur Trockne eingengt und in 500 μl Methanol aufgenommen.

2.5.3 Strukturaufklärung

2.5.3.1 Detektion von Analyten bekannter Struktur

Die Kotextrakte wurden nach intaktem Benzylglucosinolat und potentiellen Metaboliten, für die Standards vorhanden waren, durchsucht. Verwendet wurde ein Multiple Reaction Monitoring Scan (MRM) oder auch Produktionen-Analyse, ein Triple-Quadrupole Mode Scan. Zunächst wurde mit den Standards auf eine maximale Detektion der jeweiligen Molekülmasse $[\text{M}+\text{H}]^+$ in Q1 optimiert. Für die jeweilige Masse wurden anschließend spezifische Fragmente ermittelt. Diese entstehen durch Fragmentierung der Moleküle in Q2, der Kollisionszelle. Die nötigen Energien und Gase wurden ebenfalls optimiert. In Q3 konnte so ein ausreichendes Signal der spezifischen Fragmente erhalten werden.

Um eine durch den Abbau von ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat bedingte Verschiebung im Isotopenmuster der Metabolite erfassen zu können, wurde auch die jeweilige Molekülmasse des ^{13}C -Isotopomers, $[\text{M}+\text{H}]^+ + 1$, detektiert, diese entspricht der Molekülmasse des ^{13}C -Isotops der jeweiligen Verbindung.

Die so erhaltenen MRM-Methoden wurden mit der vorgeschalteten Auftrennung der Probe durch HPLC gekoppelt.

Durch die Suche nach der Ausgangsmasse, bezogen auf die spezifischen Fragmente, sowie durch die vorgeschaltete chromatographische Trennung erlaubten diese Methoden eine sehr spezifische Suche nach Substanzen in komplexen Gemischen. Durch die zusätzliche Messung der Masse $[\text{M}+\text{H}]^+ + 1$ konnte der Anteil des ^{13}C -Isotops ermittelt werden. Eine Erhöhung dieses Isotopenanteils in den Proben der Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat ließ im Vergleich mit dem Isotopenanteil in Proben der Fütterung von unmarkiertem Benzylglucosinolat, darauf schließen, dass es sich bei dem Analyten um einen Metaboliten von Benzylglucosinolat handelt. Als Negativkontrolle dienten die Proben aus Fütterungsversuchen ohne Benzylglucosinolat. In diesen sollten die Metabolite nicht nachweisbar sein.

Diese Methoden wurden sowohl auf den Gesamtextrakt als auch auf die fraktionierten Proben [2.5.2] angewendet.

Die HPLC-MS-MRM-Methoden für folgende Substanzen sind in den Tabellen 4 – 7 aufgeführt.

- Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat [Tab. 4]
- Hippursäure (Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) und Phenylacetylglycin (Bachem AG, Schweiz) [Tab. 5]
- Benzylglucosinolat [Tab. 6]
- 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat [Tab. 7]

2.5.3.2 Detektion unbekannter Metabolite

Precursor Ion Scan

Zur Identifikation unbekannter Metabolite wurden fraktionierte Proben [2.5.2] eingesetzt, über die HPLC aufgetrennt und im Massenspektrometer mittels Precursor Ion Scan (Prec) analysiert. Bei diesem Scantyp selektiert Q3 ein spezifisches Fragment. In Q1 wird gescannt, welche Masse durch Fragmentierung in Q2 dieses Fragment ergeben hat. Im vorliegenden Fall wurde das Fragment mit m/z 91 gewählt. Dieses Tropoliumion kann aus Molekülen mit einem Benzolrest gespalten werden. Die entsprechende Methode wurde Prec.91 genannt.

Bei Metaboliten, die aus dem Abbau von ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat entstehen, ergibt sich durch den Einbau eines ^{13}C -Atoms an Position 1 ein Fragment mit m/z 92. Die entsprechende Ausgangsmasse des Metaboliten muss im Vergleich zu einer unmarkierten Probe ebenfalls um die Masse eins höher sein. Die Methode wurde als Prec.92 bezeichnet.

Die Messungen erfolgten in Massenschritten von 150, bezogen auf die Scanbreite in Q1. Gescannt wurde eine Massenbreite von 150 bis 600 m/z $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Fraktionierte Proben von ^{13}C -Fütterungsversuchen wurden mit Prec.91 und Prec.92 vermessen. Da der ^{13}C -Markierungsgrad des verfütterten ^{13}C -markierten Benzylglucosinolats bei 37 % bzw. 41 % lag, konnten beide Messungen aus derselben Probe durchgeführt werden. Zusätzlich wurden Prec.91 Scans mit unmarkierten fraktionierten Proben durchgeführt.

Die in Prec.1 und Prec.2 erhaltenen Massen wurden verglichen. Es wurde nach Massen gesucht, die in Prec.2 im Vergleich zu Prec.1 eine um 1 erhöhte Masse bei gleicher Retentionszeit des Analyten hatten.

Für die ermittelte Masse wurde eine MRM-Methode optimiert. Hierfür wurde eine entsprechende fraktionierte unmarkierte Probe eingesetzt, die den Metaboliten in ausreichender Menge enthielt. Mittels dieser MRM-Methode wurden sowohl fraktionierte Proben als auch Gesamtextrakte auf das Vorkommen der entsprechenden Metabolitenmasse analysiert.

2.5.3.3 Ermittlung möglicher Strukturen unbekannter Metabolite

Um die Strukturen der unbekannten Metabolite zu klären, wurden mit den entsprechenden MRM-Methoden Fraktionen unmarkierte Proben vermessen. Die Fraktionen, die den jeweiligen Analyten enthielten, wurden unter Pressluft zur Trockne eingeeengt und in konzentriertem Methanol aufgenommen. Die exakten Massen wurde nach [2.2.3] bestimmt. Die Werte wurden genutzt, um mögliche Summenformeln der Metabolite zu ermitteln. Hierfür wurde die frei zugängliche Software Elemental Composition Calculator verwendet. Eingegeben wurde die Masse des Ions $[M+H^+]$. Die Toleranz wurde auf 2 mmu eingestellt. Anhand der Summenformeln und Doppelbindungsäquivalente konnte unter Berücksichtigung der Ausgangsstrukturen der Hydrolyseprodukte bzw. Glucosinolate auf die möglichen Strukturen der unbekannten Metabolite geschlossen werden. Die Verbindungen wurden synthetisiert und als entsprechende Standards in den jeweiligen MRM-Methoden verwendet.

2.6 Versuche zur Hemmung der Myrosinase

Organismen, Geräte und Chemikalien

- Lepidopteren: *S. exigua* und *S. littoralis*
- Microplatereader (Tecan Deutschland GmbH, Deutschland)
- Software: XFluor4
- 96-Well Microtiterplatten
- Allylglucosinolat (AppliChem GmbH, Deutschland)
- Myrosinase, $0,3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, $4,8 \text{ nmol (min } \mu\text{g Protein)}^{-1}$
- Tris-Puffer, pH 7,5 (0,5 M und 50 mM)
- GOD-PAP Kit (RANDOX Laboratories Ltd., UK)

Um den Einfluß verschiedener Proben auf die Myrosinaseaktivität zu ermitteln, wurde gereinigte Myrosinase (Burow et al., 2006) mit Extrakten aus Raupendärmen oder Darminhalt und Allylglucosinolat als Substrat inkubiert. Die Aktivität der Myrosinase wurde über die Menge an Glucose, die durch die Hydrolyse des Allylglucosinolates freigesetzt wird, ermittelt. Diese wurde mittels Glucose GOD-PAP Kit bestimmt.

Herstellung der Rohextrakte

Die Versuche wurden so konzeptioniert, dass pro Einzelprobe die einer einzelnen Raupe entsprechende Gewebemenge enthalten war. Die erforderliche Anzahl an Raupen wurde wie unten beschrieben präpariert, ein Gesamtextrakt hergestellt und die entsprechende Menge an Probe eingesetzt.

Raupendärme und der Darminhalt wurden getrennt untersucht. Das Material wurde vor den Versuchen frisch präpariert, da bei eingefrorenem Material ($-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$) nach kurzer Zeit Aktivitätsschwankungen auftraten. Raupen wurden auf Eis gekühlt. Kopf, erstes Segment und Abdominalsegment vor den Nachschiebern wurden abgeschnitten und der gesamte Darm von einem Ende her entnommen. In einer Petrischale wurde der Darm der Länge nach aufgeschnitten. Der Darminhalt ließ sich mit einem Spatel vom Darm schieben. Um den Darm von Nahrungsresten zu befreien, wurde er mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, gespült. Anschließend wurden die

gereinigten Därme in ein Eppendorfgefäß mit 50 µl 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5 pro Darm überführt und bis zur Extraktion auf Eis gelagert. Die Darminhalte wurden ohne Puffer auf Eis gelagert. Beide Fraktionen wurden mit einem Mini-Pistill homogenisiert und bei 20000 *g* und 5 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend auf ihren Einfluss auf die Myrosinaseaktivität untersucht. Untersucht wurden native Extrakte und Extrakte, die 5 min auf 95 °C erhitzt wurden.

Enzymassay

Der Enzymassay wurde in einem Volumen von 100 µl in 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 bei einer Substratkonzentration von 1 mM durchgeführt [Tab. 15]. Für jede Myrosinasekonzentration wurden 2 Ansätze vermessen, Ansatz A mit Substrat und Ansatz B ohne Substrat. Um nur die von der Myrosinase freigesetzte Glucose bestimmen zu können, wurde mit Ansatz B die Ausgangsmenge an Glucose in den Proben ermittelt. Die Myrosinase wurde 1:10 (Vol/Vol) mit Wasser verdünnt.

Tab. 15: Pipettierschema für den Myrosinaseassay. Die zu untersuchenden Proben waren Rohextrakte aus Darm und Darminhalt von *S. exigua* und *S. littoralis*

	Ansatz A	Ansatz B	Kontrolle
Probe	50 µl		-
0,5 M Tris-Puffer, pH 7,5	10 µl		10 µl
10 mM Allylglucosinolat	10 µl	-	10 µl
Myrosinase 1:10	0, 5, 10, 20 µl		0, 5, 10, 20 µl
H ₂ O	ad 100 µl		ad 100 µl

Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Um denaturiertes Material abzutrennen wurde 10 min mit 15000 *g* zentrifugiert. 25 µl des Überstandes oder 25 µl von Glucose-Standardlösungen (0,55 mM, 1,1 mM, 1,65 mM, 2,75 mM)

wurden für die Glucosebestimmung mit 100 µl GOD-PAP Reagenz (hergestellt nach Angaben des Herstellers) versetzt. Abschließend wurde nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37 °C die Absorption bei 500 nm mit einem Tecan-Microplatereader bestimmt.

Auswertung

Aus der Absorption bei 500 nm wurde mittels Kalibrationsgerade die Menge an freigesetzter Glucose ermittelt, die als Maß für die Myrosinaseaktivität dient. Bei der Bestimmung der Myrosinaseaktivität, unter Zusatz des Darmextrakts bzw. des Darminhaltes, wurde von der jeweiligen Absorption des Ansatzes A die Absorption des Ansatzes B subtrahiert. Anschließend wurde für jeden Ansatz die Menge an freigesetzter Glucose ermittelt. Zusätzlich wurde die prozentuale Aktivität der Myrosinase in Ansätzen mit 20 µl zugesetzter Myrosinase, bezogen auf die jeweiligen Ansätze, denen keine Extrakte zugesetzt wurden, berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Stoffwechsel von ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat

Der Einsatz von ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat als Tracer ermöglichte, das von den Raupen aufgenommene Benzylglucosinolat zu verfolgen. Hierfür wurde Blattmaterial (von Pflanzen mit bekanntem Glucosinolat- und Hydrolyseproduktprofil) oder Bohnendiät mit dem Tracer markiert und an Raupen verfüttert. Untersucht wurden der Verbleib der Radioaktivität im Raupenkörper oder die Ausscheidung mit dem Kot sowie die Anzahl ^{14}C -markierter Metabolite.

3.1.1 Optimierung der Fütterungsversuche

Als Basis für die Fütterungsversuche wurden mit *S. exigua* Versuche zur Gewährleistung eines reproduzierbaren Metabolitenmusters (innerhalb natürlicher Schwankungen) durchgeführt. Dabei konnte kein absolut gleichbleibendes Muster erwartet werden, da zu den in den Versuchen untersuchten, gezielt variierten Faktoren auch solche kamen, die nicht beeinflusst werden konnten, wie z.B. das jahreszeitlich bedingte unterschiedliche Wachstum der Raupen oder auch die durch die Lieferung beeinflusste Qualität der Gelege. Die Reproduzierbarkeit bezog sich dementsprechend auf die qualitative, aber nicht auf die quantitative Zusammensetzung der Metabolite.

Stabilität des Tracers

Um sicherzustellen, dass das ^{14}C -markierte Benzylglucosinolat über die Versuchszeiten der Fütterungsversuche stabil ist und nicht von den Pflanzen abgebaut wird, wurden zwei Methoden der Markierung verglichen. Verglichen wurden *A. thaliana* Col-0-Blätter, die durch Aufpipettieren des Tracers auf die Blattoberfläche markiert wurden, mit Blättern, die den Tracer über den Blattstiel aufgenommen hatten. In Radiochromatogrammen von methanolischen Blattextrakten beider

Applikationsmethoden wurde nach 1 h, 2 h und 3 h nur ^{14}C -markiertes Benzylglucosinolat wiedergefunden [Abb. 9]. Nach 21 h betrug der Anteil an ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat in Extrakten von Blättern, auf die ^{14}C -Benzylglucosinolat aufpipettiert wurde, 99 % und in Extrakten von Blättern, die ^{14}C -Benzylglucosinolat aufgesaugt hatten, 82 %. Der Versuch wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Die Wiederfindungsrate der eingesetzten Radioaktivität betrug bei aufpipettiertem ^{14}C -Benzylglucosinolat im Mittel 69 %, bezogen auf die aufgetragene Radioaktivität. Bei aufgesaugtem ^{14}C -Benzylglucosinolat lag sie bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität bei 41 %, bezogen auf die von den Blättern tatsächlich aufgenommene Radioaktivität bei 48 %.

Beide Applikationsmethoden wurden in Fütterungsversuchen mit Raupen eingesetzt. Die Blätter wurden in der Regel nach 5 bis 6 h von den Raupen gefressen, oder aus dem Versuch entfernt und durch frisch markierte Blätter ersetzt.

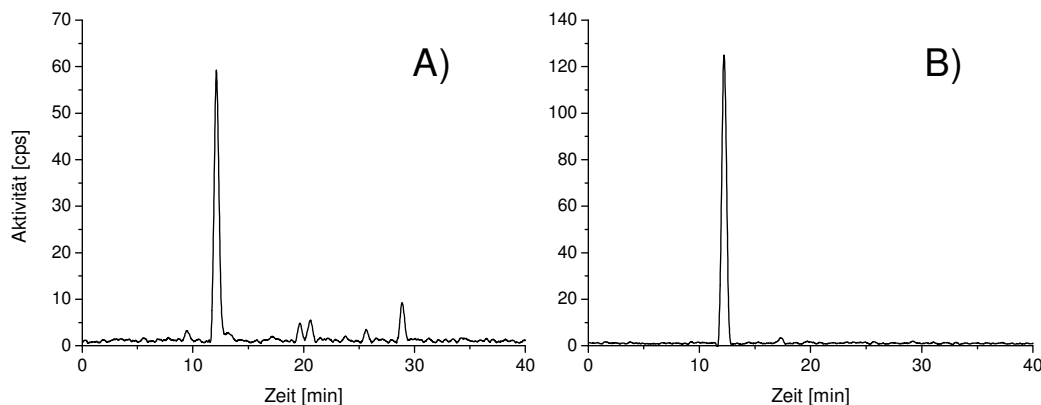


Abb. 9: **Stabilität von ^{14}C -Benzylglucosinolat in und auf Blattmaterial.** *A. thaliana* Col-0-Blätter wurden mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat markiert, A) durch Aufnahme des Tracers über die Blattstiele, B) durch Aufpipettieren des Tracers auf die Blattoberfläche. Die Blätter wurden nach 21 h mit Methanol extrahiert und die Extrakte an der HPLC mit Radiodetektor vermessen, Gradient-1. Gezeigt sind entsprechende Radiochromatogramme.

Einfluss der Applikationsmethode auf das Metabolitenmuster im Kot

Die beiden Methoden, Blätter mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat zu präparieren, sollten bezüglich ihres Einflusses auf das Metabolitenmuster im Kotextrakt verglichen werden. Durch eine möglichst hohe Radioaktivität im Kotextrakt sollte ein möglichst vollständiges Bild des Metabolitenmusters erhalten werden. Raupen von *S. exigua* wurden 4 Tage mit ^{14}C -markierten Blättern gefüttert.

Die mit Kotextrakten erhaltenen Chromatogramme zeigten quantitative Unterschiede im Metabolitenmuster, unterschieden sich aber nicht in der qualitativen Zusammensetzung der Hauptmetaboliten [Abb. 10]. Die Peaks 1 bis 4 wurden als Hauptmetabolite angesehen.

Da kein qualitativer Unterschied im Metabolitenmuster der beiden Proben festgestellt werden konnte und die Hauptmetabolite in beiden Proben ausreichend vorhanden waren, wurden beide Applikationsmethoden weiter angewendet.

Durch Co-Chromatographie konnte Peak 1 ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat zugeordnet werden. Die Peakfläche betrug bei der Probe mit aufpipettiertem Benzylglucosinolat 26 %, bei aufgesaugtem Benzylglucosinolat 33 % der Gesamtpeakfläche.

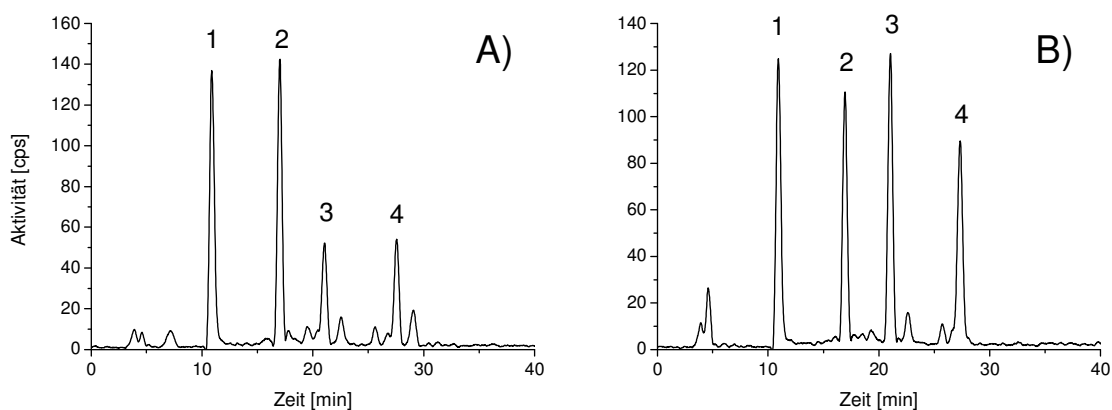


Abb. 10: **Einfluss der Applikationsmethode des Tracers auf das Metabolitenmuster.** An Raupen der Gattung *S. exigua* wurden *A. thaliana* Col-0-Blätter, die mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat markiert worden waren, verfüttert. A) Blätter wurden durch Aufnahme des Tracers über die Blattstiele markiert, B) Blätter wurden durch Auftragen des Tracers auf die Blattoberfläche markiert. Raupenkot wurde über vier Tage gesammelt und für die jeweilige Applikationsmethode gepoolt und extrahiert. Die Extrakte wurden an der HPLC mit Radiodetektor vermessen, Gradient-3. Gezeigt sind entsprechende Radiochromatogramme.

Abhängigkeit des Metabolitenmusters von der Dauer des Fütterungsversuchs

Um zu untersuchen, ob sich die qualitative Zusammensetzung des Metabolitenmusters über einen Zeitraum von mehreren Tagen ändert (z. B. durch Induktion von Entgiftungsmechanismen), wurden Kotproben von fünf aufeinander folgenden Tagen gesammelt und getrennt analysiert. Um das Gesamtbild zusätzlich mit den Ergebnissen aus dem Versuch zum Einfluss der Applikationsmethode vergleichen zu können, wurden von jeder Probe 50 µl entnommen, die Proben gemischt, auf 110 µl eingeeengt und zusätzlich an der HPLC mit Radiodetektor vermessen.

In der Probe von Tag 1 konnten bereits die in den vorangegangenen Versuchen als Peak 1 bis 3 bezeichneten Metabolite gefunden werden [Abb. 11]. Peak 4 war erst nach dem dritten Tag nachweisbar. Eine Entwicklung des Metabolitenmusters über die Dauer des Versuches war insofern zu erkennen, als dass die Anzahl der Metabolite abnahm (an den Tagen 1 und 2 jeweils sieben Metabolite) und sich qualitativ das Metabolitenmuster mit den Peaks 1 bis 4 ausprägte. Der Anteil an Peak 3 nahm deutlich zu. Auch im Chromatogramm der Summe der fünf Proben ist er neben intaktem Benzylglucosinolat (Peak 1) ein Hauptmetabolit. Die Anteile der Metabolite 2 und 4 waren über den Versuch nicht konstant. Im Vergleich des Chromatogramms der Summe der fünf Proben mit den Chromatogrammen der beiden Applikationsmethoden [Abb. 10] wurde erneut deutlich, dass die quantitative Zusammensetzung der Metabolite schwankt. Das Auftreten der Hauptmetabolite, Peak 1 bis 4 konnte aber bestätigt werden.

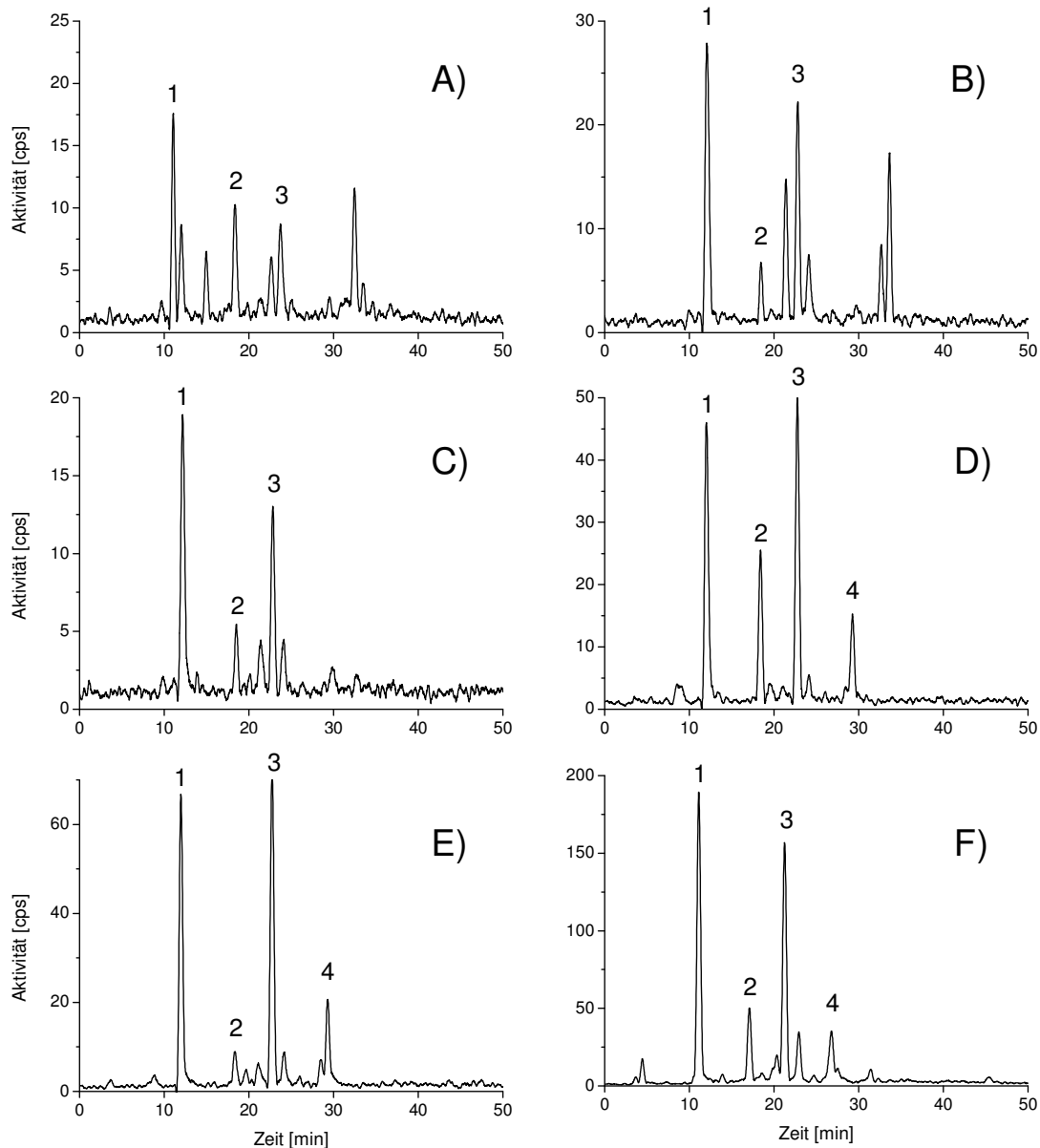


Abb. 11: Abhängigkeit des Metabolitenmusters von der Dauer des Fütterungsversuchs. Raupen von *S. exigua* fraßen über einen Zeitraum von 5 Tagen auf *A. thaliana* Col-0-Blättern, die mit ^{14}C -Benzylglucosinolat markiert waren. Der Kot der einzelnen Tage wurde getrennt gesammelt und extrahiert. Zusätzlich wurde eine Probe aus Kotextrakten aller Tage angefertigt. A) Kotextrakt von Tag 1, B) Kotextrakt von Tag 2, C) Kotextrakt von Tag 3, D) Kotextrakt von Tag 4, E) Kotextrakt von Tag 5, F) Mischung aus Kotextrakten von Tag eins bis Tag fünf (Verschiebungen der Retentionszeit sind durch zeitlich unterschiedliche Messungen bedingt und wurden durch Standards überprüft). Gezeigt sind Chromatogramme der HPLC mit Radiodetektor, Gradient-3.

Weitere untersuchte Einflussfaktoren

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss verschiedener Versuchsparameter auf das Metabolitenmuster untersucht. Dies waren verschiedene Extraktionsmittel für die Kotextraktion, die Lagerungsbedingungen (4 °C und -20 °C) des Kots über den Fütterungszeitraum und mögliche enzymatische Reaktionen während der Kotaufarbeitung.

Da in den Chromatogrammen keinerlei Unterschied, weder qualitativ noch quantitativ festgestellt werden konnte, sind die Versuche hier nicht weiter dargestellt.

3.1.2 Vergleich des Metabolitenmusters in *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni*

Um prinzipielle Unterschiede in der Entgiftung des Glucosinolat-Myrosinase Systems zu untersuchen, wurden an Raupen von *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni* *A. thaliana* Col-0-Blätter, die ¹⁴C-markiertes Benzylglucosinolat über die Blattstiele aufgesogen hatten, verfüttert. Im Anschluß erhielten die Raupen unmarkierte Blätter. Untersucht wurde die Verteilung der Radioaktivität auf Raupenkörper und den Kot, hier wiederum auf lipophile und hydrophile Ausscheidungsprodukte.

Die Chromatogramme der Kotextrakte von *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni* zeigen, dass *S. exigua* und *S. littoralis* die gleichen Hauptmetabolite bilden [Abb. 12]. Die bereits in [3.1.1] als Peak 1 bis 4 bezeichneten Metabolite waren in beiden Chromatogrammen nachweisbar. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Versuchen reproduziert werden. Quantitative Schwankungen wurden aufgrund der Ergebnisse aus [3.1.1] nicht berücksichtigt. Die Metabolitenzusammensetzung bei *T. ni* unterschied sich durch den sehr geringen Anteil an Peak 1, welcher mit intaktem Benzylglucosinolat co-eluiert, und durch den ebenfalls extrem kleinen Anteil an Peak 4. Der Versuch wurde mit *T. ni* einmal wiederholt, es wurde das gleiche Metabolitenmuster erhalten. Das Ergebnis kann nur als Tendenz gesehen werden, da die Fütterungszeit nur 24 h betrug.

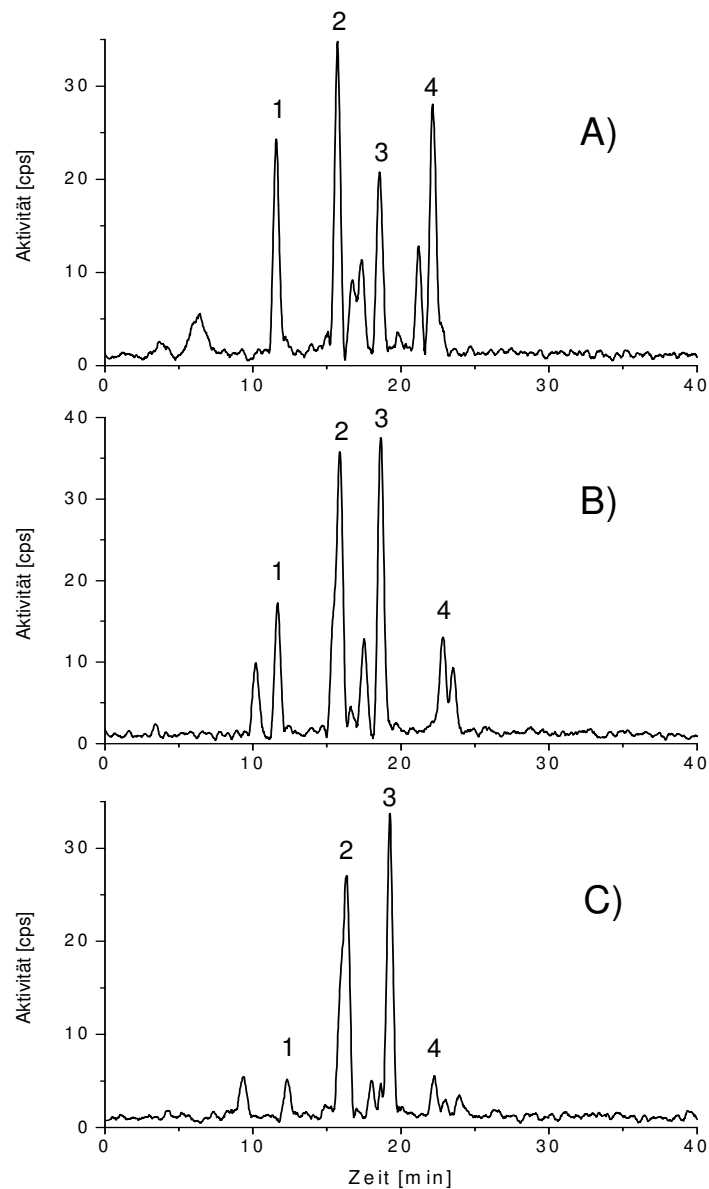


Abb. 12: Ausscheidungsprodukte von ^{14}C -Benzylglucosinolat in Kotextrakten von *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni*. A) *S. exigua*, B) *S. littoralis*, C) *T. ni*. Raupen fraßen 24 h auf ^{14}C -markierten Blättern von *A. thaliana* Col-0. Kot wurde gesammelt und extrahiert. Die Extrakte wurden an einer HPLC mit Radiodetektor vermessen, Gradient-2. Gezeigt sind die entsprechenden Radiochromatogramme (Verschiebungen der Retentionszeit sind durch zeitlich unterschiedliche Messungen bedingt und wurden durch Standards überprüft).

Der größte Teil der Radioaktivität wurde bei allen drei Spezies im wässrigen Kotextrakt wiedergefunden [Tab. 16]. Der Anteil, der in den Raupenkörpern detektiert wurde, lag zwischen 2 % und 4 %. Eine Sequestrierung von Glucosinolaten oder eine Anreicherung von Metaboliten im Raupenkörper findet somit nicht statt. Die im Dichlormethanextrakt detektierte Radioaktivität könnte von nicht metabolisierten Hydroseprodukten des ^{14}C -Benzylglucosinolats stammen. Ein Hinweis darauf ist der Umstand, dass nach dem Einengen der Dichlormethanphasen und erneutem Aufnehmen in 120 μl Dichlormethan nicht mehr genug Radioaktivität für eine HPLC-Analyse vorhanden war. Die in den Raupenkörpern und im Kot insgesamt wiedergefundene Radioaktivität betrug 26 % bis 30 %. Eine Wiederholung des Versuchs mit *S. exigua* und *S. littoralis* ergab ähnliche Ergebnisse.

Tab. 16: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in Fraßversuchen. *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni*. Raupen fraßen 24 h auf mit ^{14}C -Benzylglucosinolat markierten Blättern von *A. thaliana* Col-0. Untersucht wurden die Raupenkörper sowie wässrige und Dichlormethanextrakte des Raupenkots. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Radioaktivität im Raupenkörper und Kot von der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität. Die Wiederfindungsrate gibt den Anteil der Radioaktivität an, der in Raupenkörper und Raupenkot (Zeile 1-3) wiedergefunden werden konnte, bezogen auf die von den Raupen aufgenommene Radioaktivität [Tab 12].

	<i>S. exigua</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>T. ni</i>
Raupenkörper	4 %	4 %	2 %
Kot (CH_2Cl_2)	19 %	15 %	10 %
Kot (H_2O)	77 %	81 %	88 %
Wiederfindungsrate	26 %	30 %	29 %

3.1.3 Zuordnung der Metabolite zu Hydrolyseprodukten und intaktem Glucosinolat

Als Metabolite kommen (neben dem unmetabolisiert ausgeschiedenen Benzylglucosinolat) Entgiftungsprodukte von intaktem Benzylglucosinolat oder von den Hydrolyseprodukten Benzylisothiocyanat und Phenylacetonitril in Frage. Zur Zuordnung der Metabolite zu diesen Verbindungen wurde den Raupen ^{14}C -Benzylglucosinolat mit einer Nahrung (Pflanzenmaterial oder Bohnendiät)

verabreicht, die vorwiegend die Bildung einer dieser Ursprungssubstanzen ermöglichte: ohne Myrosinase (Bohnendiät) wird Benzylglucosinolat in der Nahrung nicht hydrolysiert, *T. majus* und die Mutante *A. thaliana* SALK_072600 produzieren bei Gewebeverletzung nur Isothiocyanate, *A. thaliana* Col-0 produziert bei Gewebeverletzung neben Isothiocyanaten auch einfache Nitrile.

Fütterungsversuche mit Bohnendiät, welche mit ^{14}C -Benzylglucosinolat markiert worden war (aber keine Myrosinase enthält), zeigte, dass sowohl *S. exigua* als auch *S. littoralis* eine Verbindung, die mit intaktem ^{14}C -Benzylglucosinolat co-eluiert, wieder ausscheiden [Abb. 13]. Der Anteil betrug bei *S. exigua* 92 %, bei *S. littoralis* 85 %. Bei *S. exigua* war nur ein Nebenprodukt zu sehen, bei *S. littoralis* waren es drei (in kleinen Mengen). Der Versuch wurde mit beiden Spezies mit gleichen Ergebnissen wiederholt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Benzylglucosinolat in Abwesenheit von Myrosinase größtenteils unmetabolisiert wieder ausgeschieden wird.

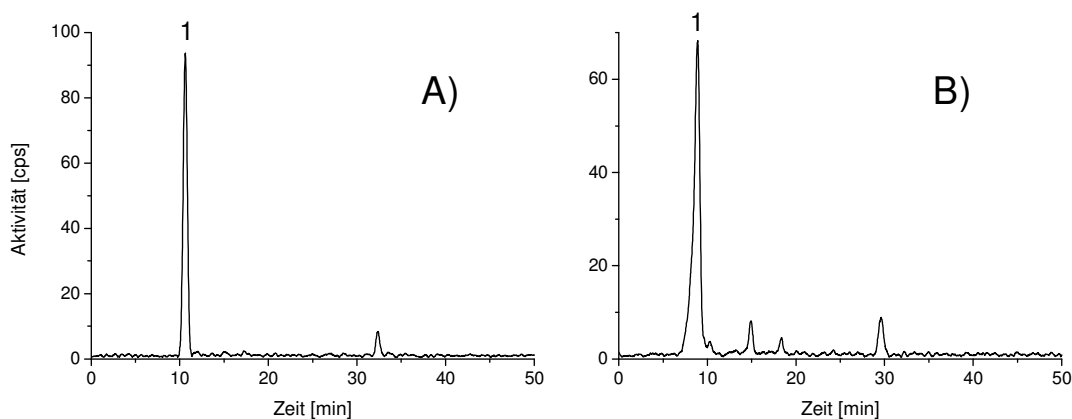


Abb. 13: Ausscheidung von intaktem Benzylglucosinolat. An Raupen von *S. exigua* (A) und *S. littoralis* (B) wurde Bohnendiät mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat verfüttert. Kot wurde gesammelt und extrahiert. Gezeigt sind Radiochromatogramme der Kotextrakte, Gradient-3 (Verschiebungen der Retentionszeit sind durch zeitlich unterschiedliche Messungen bedingt und wurden durch Standards überprüft).

In Fütterungsversuchen mit ^{14}C -markierten Blättern von *T. majus* und *A. thaliana* SALK_072600, die nur Isothiocyanate als Hydrolyseprodukte bilden, konnte gezeigt werden, dass Peak 2 kein Hauptmetabolit in den entsprechenden Kotextrakten ist [Abb. 14]. Im Umkehrschluss legt dies eine Zuordnung von Peak 2 als Metabolit des Phenylacetonitrils nah. In Fütterungsversuchen mit *S. exigua* und *S. littoralis* und ^{14}C -markierten Blättern von *A. thaliana* Col-0 konnte Peak 2 wieder nachgewiesen werden [Abb. 15]. Dies ist ein weiteres Zeichen dafür, dass der Peak auf die Metabolisierung von Phenylacetonitril zurückzuführen ist. Peak 3 war in allen Chromatogrammen nachweisbar, so dass es sich hier um einen Metabolit des Benzylisothiocyanats handeln müsste. In allen Proben konnte der mit intaktem Benzylglucosinolat co-eluierende Peak 1 nachgewiesen werden. Eine weitere Auffälligkeit war, dass in allen Proben ein mit Peak 5 bezeichneter Metabolit in größeren Mengen nachweisbar war, der in vorigen Versuchen konstant in so kleinen Mengen auftrat, dass er als Nebenmetabolit betrachtet wurde. Peak 4 fehlte im Chromatogramm von Kotextrakt von *S. littoralis*, die auf markierten *A. thaliana* SALK_072600-Blättern gefressen hatten und war nur in geringen Mengen in Kotextrakten von *S. exigua*, die auf *T. majus*-Blättern gefressen hatten, nachweisbar. Die Fütterungsversuche mit *T. majus* und *S. exigua* und *S. littoralis* wurden mit gleichem Ergebnis wiederholt. Fütterungsversuche mit *T. majus* waren schwerer durchführbar, da die Raupen auf Blättern von *T. majus* nicht gut fraßen, dies gilt besonders für *S. exigua*. Dies hatte eine relativ geringe Aufnahme von ^{14}C -markiertem Blattmaterial zur Folge, was sich in der geringen Aktivität [cps] der Chromatogramme widerspiegelt.

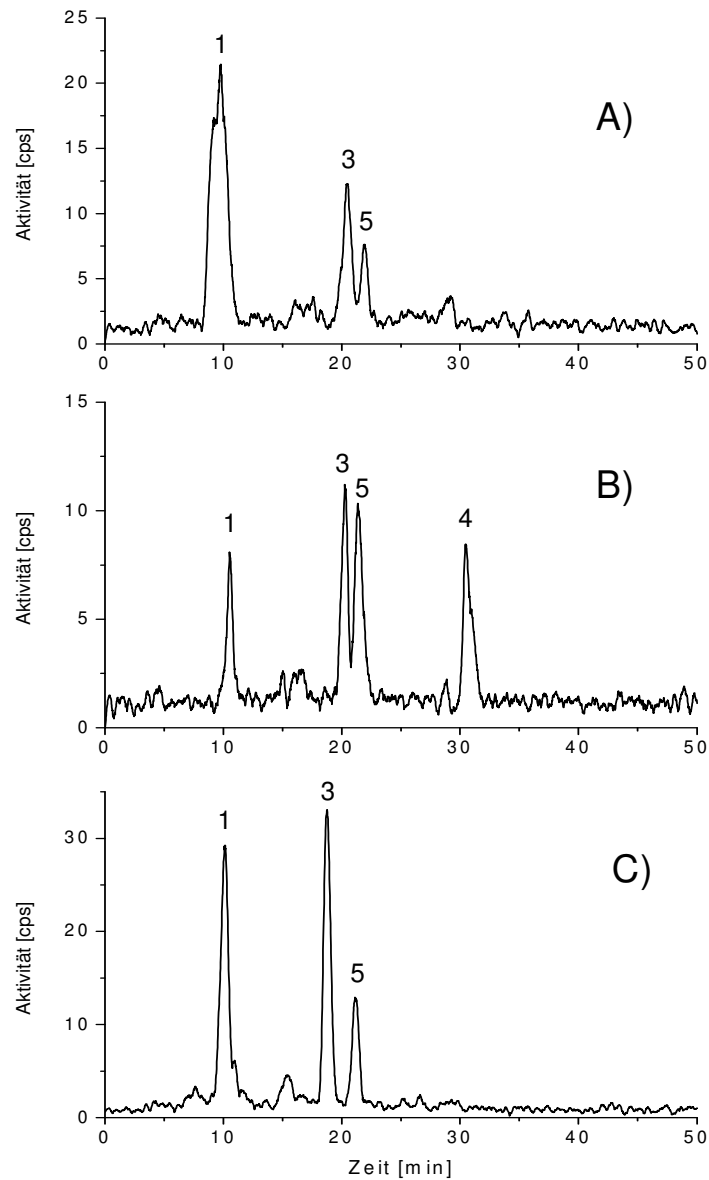


Abb. 14: Metabolite des Benzylisothiocyanats. An *S. exigua* und *S. littoralis* wurden mit ^{14}C -Benzylglucosinolat markierte Blätter von Pflanzen verfüttert, die als Hydrolyseprodukte Isothiocyanate bilden. Der Kot wurde gesammelt und extrahiert. Die Extrakte wurden mittels HPLC mit Radiodetektor analysiert. A) Kotextrakt von *S. exigua*, die auf *T. majus*-Blättern gefressen hatten, B) Kotextrakt von *S. littoralis*, die auf *T. majus*-Blättern gefressen hatten, C) Kotextrakt von *S. littoralis*, die auf *A. thaliana* SALK_072600-Blättern gefressen hatten. Gezeigt sind entsprechende Radiochromatogramme, Gradient-3 (Verschiebungen der Retentionszeit sind durch zeitlich unterschiedliche Messungen bedingt und wurden durch Standards überprüft).

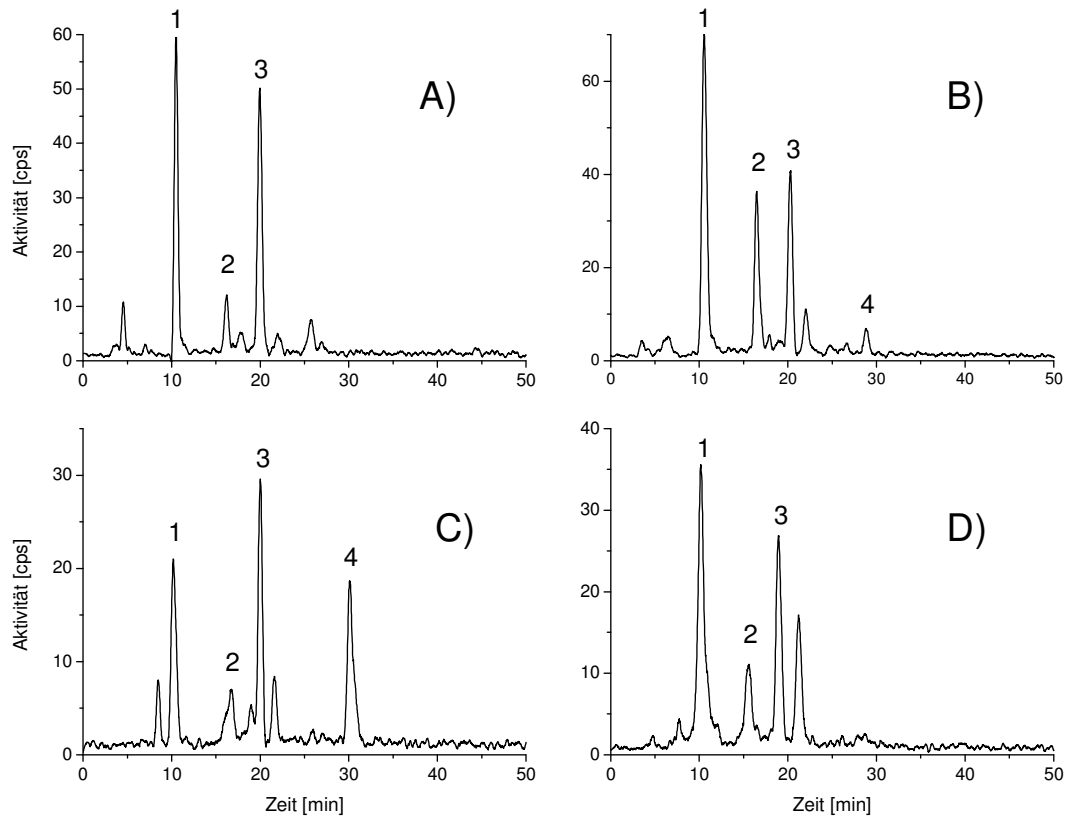


Abb. 15: Veränderung des Metabolitenmusters in Abhängigkeit von der Verweildauer des Kots bei Raumtemperatur. *S. exigua* und *S. littoralis* wurden mit ^{14}C -Benzylglucosinolat markierten *A. thaliana* Col-0-Blättern gefüttert. Der Kot wurde gesammelt und extrahiert. Die Kotextrakte wurden an der HPLC mit Radiodetektor vermessen. A) Kotextrakt von *S. exigua*, leicht angetrockneter Kot wurde mit extrahiert. B) Kotextrakt von *S. exigua*, angetrockneter Kot wurde ausgesondert und nicht mit extrahiert. C) Kotextrakt von *S. littoralis*, leicht angetrockneter Kot wurde mitextrahiert. D) Kotextrakt von *S. littoralis*, angetrockneter Kot wurde ausgesondert und nicht mitextrahiert. Gezeigt sind entsprechende Radiochromatogramme, Gradient-3 (Verschiebungen der Retentionszeit sind durch zeitlich unterschiedliche Messungen bedingt und wurden durch Standards überprüft).

Bei Wiederholungen der Fütterungsversuche mit *S. littoralis* und *S. exigua* mit ^{14}C -markierten *A. thaliana* Col-0-Blättern kam es zu Veränderungen des Metabolitenmusters [Abb. 15]. Peak 4 konnte in allen fünf Versuchen mit *S. exigua*, die nach den Optimierungsversuchen durchgeführt wurden, nur noch in sehr geringen Mengen oder gar nicht mehr nachgewiesen werden. In Fütterungsversuchen mit *S. littoralis* war Peak 4 in zwei Versuchen ein Hauptmetabolit (größter Peak), in zwei folgenden Versuchen fehlte er. Bei den letztgenannten Versuchen wurde die Zeit, in der nachts nicht stündlich Kot gesammelt werden konnte, auf 4 Stunden verkürzt, angetrockneter Kot wurde aussortiert und nicht extrahiert. Im Rahmen der Optimierungsversuche war gezeigt worden, dass die Lagerung bei 4 °C bzw. -20 °C das Metabolitenmuster nur

unwesentlich beeinflusst. Aufgrund der Versuchsergebnisse, die nach den Optimierungsversuchen erhalten wurden, kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es nach der Defäkation zu weiteren Reaktionen im Kot kommen kann, wenn der Kot längere Zeit (4 h bis 8 h) bei Raumtemperatur und unter normaler Atmosphäre gelagert wird.

3.2 Identifizierung von Metaboliten

Die Struktur der in den Versuchen mit ^{14}C -markierten Benzylglucosinolat ermittelten Metabolite wurde mit Fütterungsversuchen mit ^{13}C -markiertem und unmarkiertem Benzylglucosinolat untersucht. Die Analyse der Kotextrakte erfolgte mittels Massenspektrometrie. Hierfür wurden parallel Fütterungsversuche mit ^{14}C -markiertem, ^{13}C -markiertem und unmarkiertem Benzylglucosinolat durchgeführt. Die Kotextrakte aus den Versuchen mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat erlaubten eine Kontrolle des Metabolitenmusters und dienten als Marker bei der Fraktionierung. Durch die Kotextrakte aus Versuchen mit ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat wurden die Metabolite, die in Versuchen mit unmarkiertem Benzylglucosinolat gefunden wurden, identifiziert.

3.2.1 Analyten bekannter Struktur

Für die Suche nach Analyten bekannter Struktur wurden Kotextrakte von *S. exigua* und *S. littoralis* fraktioniert. Fraktionen, die analog zu Fraktionen mit hoher Radioaktivität in Fütterungsversuchen mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat gesammelt wurden, wurden mittels HPLC-MS analysiert.

Die Kotextrakte und entsprechende Fraktionen wurden auf intaktes Benzylglucosinolat und die potentiellen Metaboliten Hippursäure, Phenylacetylglycin, Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat und 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat untersucht. Für alle Substanzen lagen Standards vor, mit welchen MRM-Scan-Methoden für die HPLC-MS optimiert wurden.

3.2.1.1 Benzylglucosinolat

Die Ausscheidung von intaktem Benzylglucosinolat wurde bereits auf Grund von Versuchen mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat vermutet (Peak 1) [3.1.3]. Massenspektrometrisch identifiziert wurde Benzylglucosinolat in Fütterungsversuchen mit *A. thaliana* 35S:CYP79A2-Pflanzen, die Benzylglucosinolat akkumulieren, und *S. exigua* und *S. littoralis* [Abb. 16]. Auch in Kotextrakten von *S. littoralis*, die auf ^{13}C -Benzylglucosinolat-markierten *A. thaliana* Col-0-Blättern fraßen, konnte die Ausscheidung von nicht hydrolysiertem, ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat nachgewiesen werden [Abb. 16]. Der prozentuale Anteil des ^{13}C -Isotopenpeaks des Benzylglucosinolat lag bei 41 %, was der Markierungsrate des eingesetzten Glucosinolats entsprach. Als Negativkontrolle wurden Kotextrakte beider Raupenspezies, die auf *A. thaliana* Col-0 fraßen (kein Benzylglucosinolat) eingesetzt. In diesen Proben war kein Benzylglucosinolat nachweisbar. In Kotextrakten von *S. exigua* und *S. littoralis*, die auf *T. majus*-Blättern fraßen, welche Benzylglucosinolat endogen enthalten, konnte nur ein sehr geringes oder kein Signal für Benzylglucosinolat erhalten werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die in Fütterungsversuchen mit *T. majus* mit aufgetragenem Tracer erhalten wurden [Abb. 14] und bei denen ein Teil des auf die Blattoberfläche aufgetragenen ^{14}C -Benzylglucosinolat intakt im Kot wiedergefunden wurde.

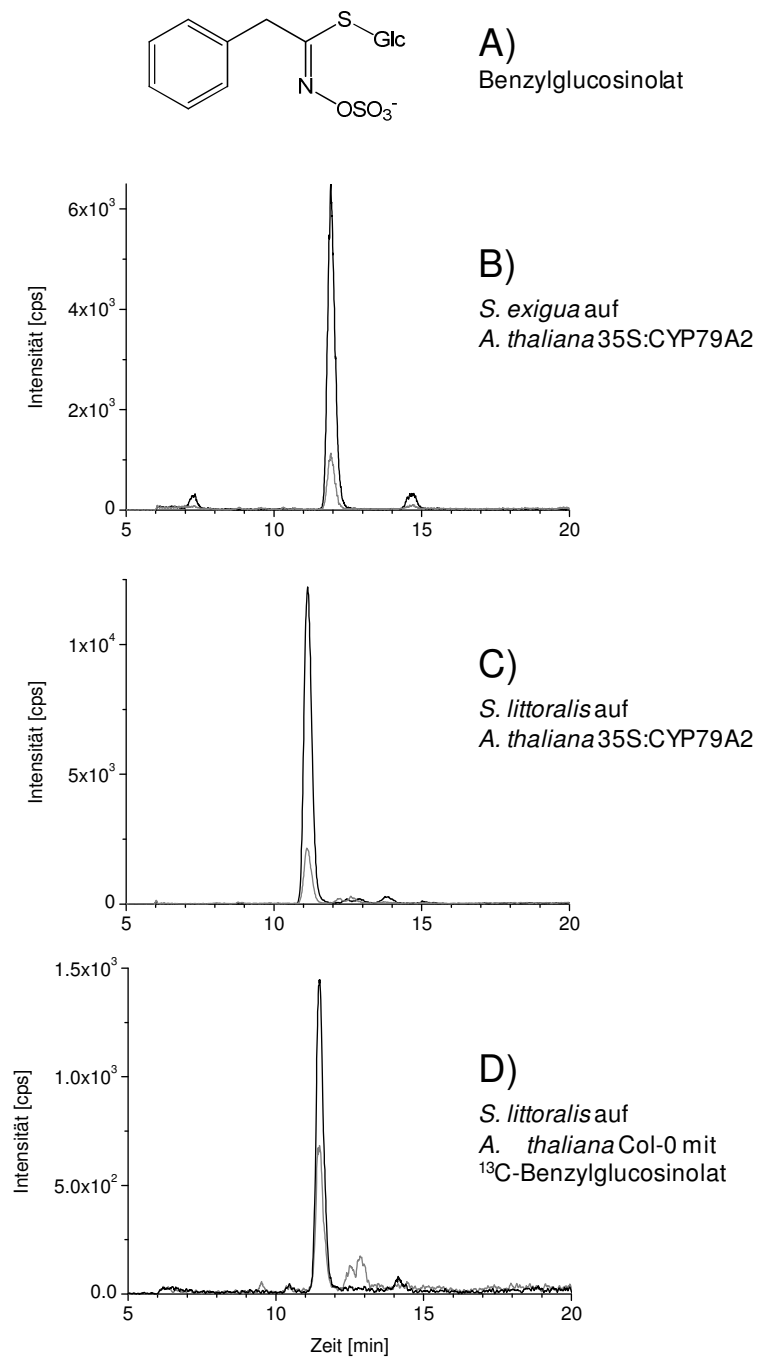


Abb. 16: Nachweis von intaktem Benzylglucosinolat in Kotproben von *S. exigua* und *S. littoralis*. A) Struktur von Benzylglucosinolat, B-D) HPLC-MS-Analyse von Kotextrakten auf Benzylglucosinolat. Raupen von *S. exigua* (B) und *S. littoralis* (C, D) wurden Blätter von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 (B, C) und mit ^{13}C -Benzylglucosinolat markierte *A. thaliana* Col-0-Blätter (D) gefüttert. Der Kot wurde gesammelt und extrahiert. Die Kotextrakte wurden massenspektrometrisch mittels MRM-Scan analysiert. Schwarze Linie: Benzylglucosinolat, graue Linie: ^{13}C -Isotop des Benzylglucosinolats.

3.2.1.2 Hippursäure und Phenylacetylglycin

Hippursäure und Phenylacetylglycin wurden bereits für *P. rapae* als Metabolite von Phenylacetonitril nachgewiesen (Vergara et al., 2006 und 2007 (Erratum)).

Vermessen wurden Kotextrakte von *S. exigua* und *S. littoralis*, die auf *A. thaliana* 35S:CYP79A2, *A. thaliana* Col-0, *A. thaliana* Col-0 mit aufgetragenem ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat und *T. majus* gefressen hatten, sowie Kotextrakt von *S. littoralis*, die auf *A. thaliana* SALK_072600 mit aufgetragenem ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat gefressen hatten [Abb. 17 und 18]. Hippursäure war in allen vermessenen Kotextrakten nachweisbar.

In Proben aus Fütterungsversuchen mit ^{13}C -Benzylglucosinolat-markierten *A. thaliana*-Blättern konnte eine Erhöhung des Anteils des ^{13}C -Isotopenpeaks der Hippursäure gegenüber dem natürlichen Isotop nachgewiesen werden. In Kotextrakten von *S. exigua* lag der Anteil bei maximal 29 %, in Kotextrakten von *S. littoralis* bei 17 %. Durch diesen erhöhten Anteil des ^{13}C -Isotops der Hippursäure konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil der Hippursäure aus der Metabolisierung von Hydrolyseprodukten des ^{13}C -markierten Benzylglucosinolats stammt. Da eine Erhöhung des ^{13}C -Isotops der Hippursäure nicht eintrat, wenn *S. littoralis* auf *A. thaliana* SALK_072600 gefressen hatten (keine Nitrilbildung), ist davon auszugehen, dass Hippursäure ein Metabolit des Phenylacetonitril darstellt. Hippursäure war in Fraktionen von Peak 2 nachweisbar. Da Peak 2 schon in [3.1.3] als Metabolit von Phenylacetonitril vermutet wurde, deckt sich dies mit dem Ergebnis des Fütterungsversuchs mit ^{13}C -markierten *A. thaliana* SALK_072600-Blättern.

Da Hippursäure auch in Kotextrakten von Larven nachgewiesen werden konnte, an die *A. thaliana* Col-0-Blätter verfüttert wurden, ist Hippursäure auch ein Produkt anderer Stoffwechselprozesse.

Phenylacetylglycin konnte in allen Kotextrakten nachgewiesen werden. Da in Kotproben beider Raupenarten, welche mit ^{13}C -Benzylglucosinolat-markierten Blättern gefüttert wurden, keine Erhöhung des ^{13}C -Isotopenpeaks des Phenylacetylglycins messbar war, wurde es als Metabolit dessen Ursprung Benzylglucosinolat ist, ausgeschlossen.

In den Messungen wurde eine zweite Verbindung derselben Masse wie Phenylacetylglycin (m/z 194, $[M+H]^+$) detektiert. Diese Verbindung wird unter [3.2.2] beschrieben.

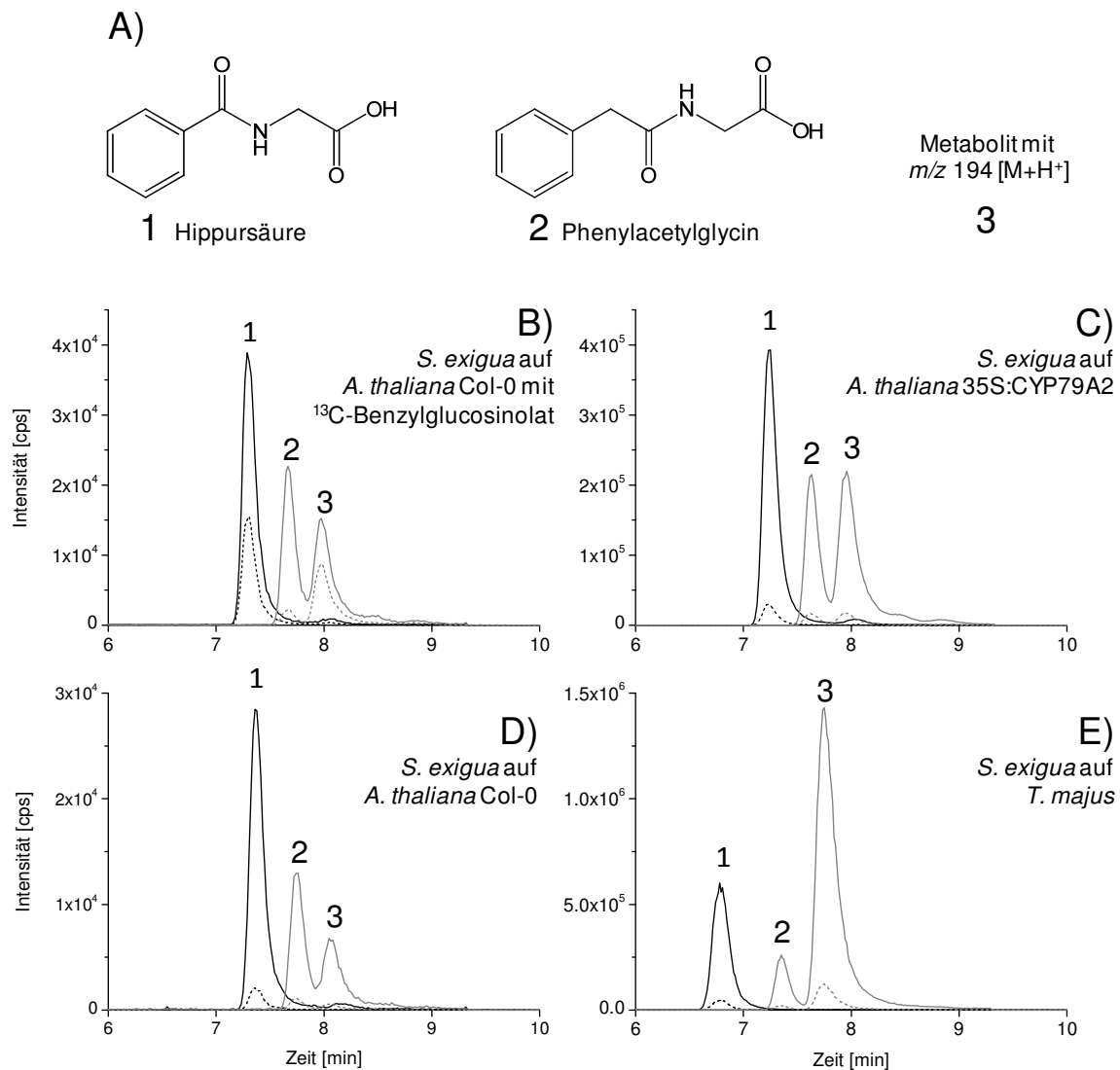


Abb. 17: Detektion der bekannten Metabolite Hippursäure und Phenylacetylglycin, sowie einer unbekannten Verbindung der Masse m/z 194 $[M+H]^+$ im Kot von *S. exigua*. A) Struktur von Hippursäure und Phenylacetylglycin, B-E) HPLC-MS Analyse von Kotextrakten. *S. exigua* fraßen auf B) *A. thaliana* Col-0-Blättern, auf die ^{13}C -markiertes Benzylglucosinolat aufgetragen wurde, C) *A. thaliana* 35S:CYP79A2-Blättern, die Benzylglucosinolat akkumulieren, D) *A. thaliana* Col-0-Blättern, die kein Benzylglucosinolat enthalten und E) *T. majus*-Blättern, die Benzylglucosinolat produzieren und nur Benzylisothiocyanat freisetzen. Der Kot wurde gesammelt und extrahiert. Die Kotextrakte wurden massenspektrometrisch mittels MRM-Scans analysiert. Schwarze durchgezogene Linie: Hippursäure; schwarze, gestrichelte Linie: ^{13}C -Isotop der Hippursäure; graue, durchgezogene Linie: Phenylacetylglycin bzw. eine Verbindung mit der Masse m/z 194 $[M+H]^+$; graue, gestrichelte Linie: ^{13}C -Isotop des Phenylacetylglycins bzw. Verbindung mit der Masse m/z 195 $[M+H]^+$.

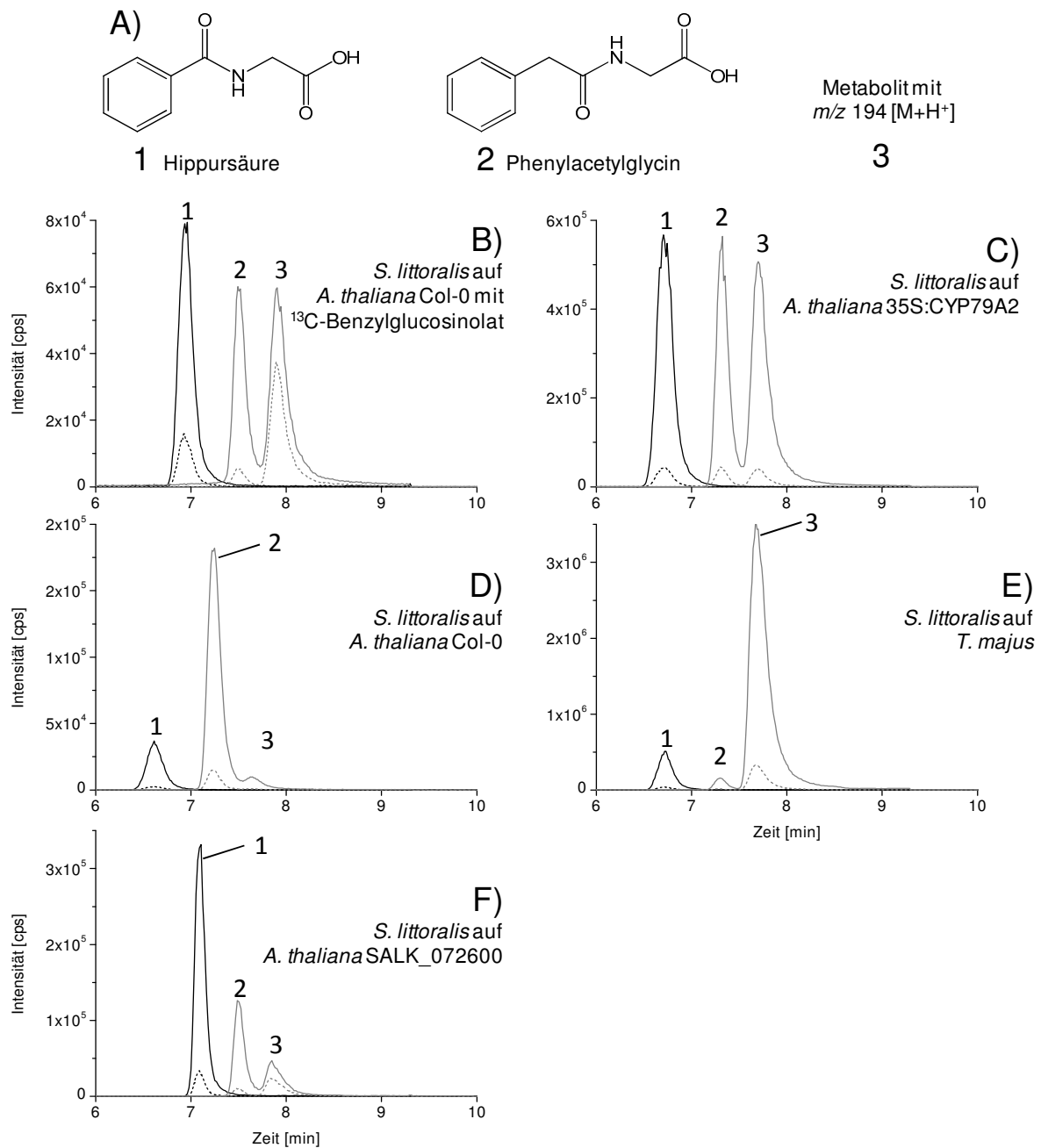


Abb. 18: Detektion der bekannten Metabolite Hippursäure und Phenylacetylglutamin, sowie einer unbekannten Verbindung der Masse m/z 194 $[M+H]^+$ im Kot von *S. littoralis*. A) Struktur von Hippursäure und Phenylacetylglutamin, B-F) HPLC-MS Analyse von Kotextrakten. *S. littoralis* fraßen auf B) *A. thaliana* Col-0-Blättern, auf die ^{13}C -markiertes Benzylglucosinolat aufgetragen wurde, C) *A. thaliana* 35S:CYP79A2-Blättern, die Benzylglucosinolat akkumulieren, D) *A. thaliana* Col-0-Blättern (kein Benzylglucosinolat), E) *T. majus*-Blättern, die Benzylglucosinolat produzieren und nur Benzylisothiocyanat freisetzen und F) *A. thaliana* SALK_072600-Blättern, die nur Isothiocyanate als Hydrolyseprodukte freisetzen, mit aufgetragenem ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat. Der Kot wurde gesammelt und extrahiert. Die Kotextrakte wurden massenspektrometrisch mittels MRM-Scans analysiert. Schwarze, durchgezogene Linie: Hippursäure; schwarze, gestrichelte Linie: ^{13}C -Isotop der Hippursäure; graue, durchgezogene Linie: Phenylacetylglutamin bzw. Verbindung mit der Masse m/z 194 $[M+H]^+$; graue, gestrichelte Linie: ^{13}C -Isotop des Phenylacetylglutamins bzw. eine Verbindung mit der Masse m/z 195 $[M+H]^+$.

3.2.1.3 Glutathionkonjugate

Kotextrakte wurden auf das Vorhandensein der Glutathionkonjugate von Benzylisothiocyanat und 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat analysiert.

Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat konnte nur einmalig in einem Kotextrakt von *S. exigua* nach Verfütterung von *T. majus*-Blättern nachgewiesen werden [Abb. 19 b]. In zwei Wiederholungen des Versuches war kein Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat detektierbar.

In Kotextrakten von *S. littoralis*, die auf *T. majus*-Blättern gefressen hatten, war Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat in zwei Versuchen nachweisbar [Abb. 19c]. Kotextrakte von *S. littoralis*, die mit *A. thaliana* Col-0-Blättern gefüttert wurden, enthielten kein Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat. In Kotextrakten von *S. littoralis*, an die Blättern von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 verfüttert wurden, konnte in zwei Versuchen Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat nachgewiesen werden [Abb. 19d], in zwei Versuchen war kein Signal detektierbar. In Kotproben aus Parallelansätzen zu diesen zwei Versuchen (in denen kein Konjugat nachweisbar war), in denen aber mit ^{14}C -Benzylglucosinolat markierte *A. thaliana* Col-0 Blätter verfüttert wurden, fehlte Peak 4. Ebenso konnte Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat in Kotextrakten von *S. littoralis*, die auf ^{13}C -markierten *A. thaliana*-Blättern gefressen hatten, nur in einem Versuch nachgewiesen werden [Abb. 19e], in dem im parallel durchgeführten Fütterungsversuch mit ^{14}C -Tracer Peak 4 vorhanden war. Die Markierungsrate des ^{13}C -Isotops des Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat betrug 40 %, was den Einbau des ^{13}C -Benzylglucosinolats bzw. des ^{13}C -Benzylisothiocyanats in den Metaboliten beweist. In Kotextrakten des Fütterungsversuches mit *A. thaliana* SALK_072600 mit aufgetragenem ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat konnte analog zu dem beschriebenen Effekt ebenfalls kein Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat nachgewiesen werden. In den Versuchen, in denen Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat nachweisbar war, war es nicht in den Fraktionen enthalten, die analog zu Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität (^{14}C -Versuche) gesammelt wurden. Stattdessen wurde Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat in Fraktionen gefunden, die 3 min nach

Peak 4 eluierten. In den parallelen ^{14}C -Versuchen enthielten diese Fraktionen nur wenig Radioaktivität.

4-Methylsulfinylbutylglucosinolat ist das natürlich vorkommende Hauptglucosinolat in *A. thaliana* Col-0 sowie in *A. thaliana* SALK_072600. In *A. thaliana* 35S:CYP79A2 ist es neben Benzylglucosinolat das in zweitgrößter Menge produzierte Glucosinolat. Das Glutathionkonjugat des 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanats könnte als Metabolit des 4-Methylsulfinylbutylglucosinolats in den analysierten Kotextrakten (nach Verfütterung aller in dieser Arbeit genutzten *A. thaliana*) vorhanden sein. Der Nachweis gelang jedoch nur in den Extrakten von Fütterungsversuchen mit *S. littoralis*, in deren Parallelversuchen mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat der Peak 4 nachweisbar war [Abb. 19f und 19g]. In Kotextrakten beider Raupenarten war nach Verzehr von *T. majus*-Blättern, die kein 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat enthalten, 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat nicht nachweisbar.

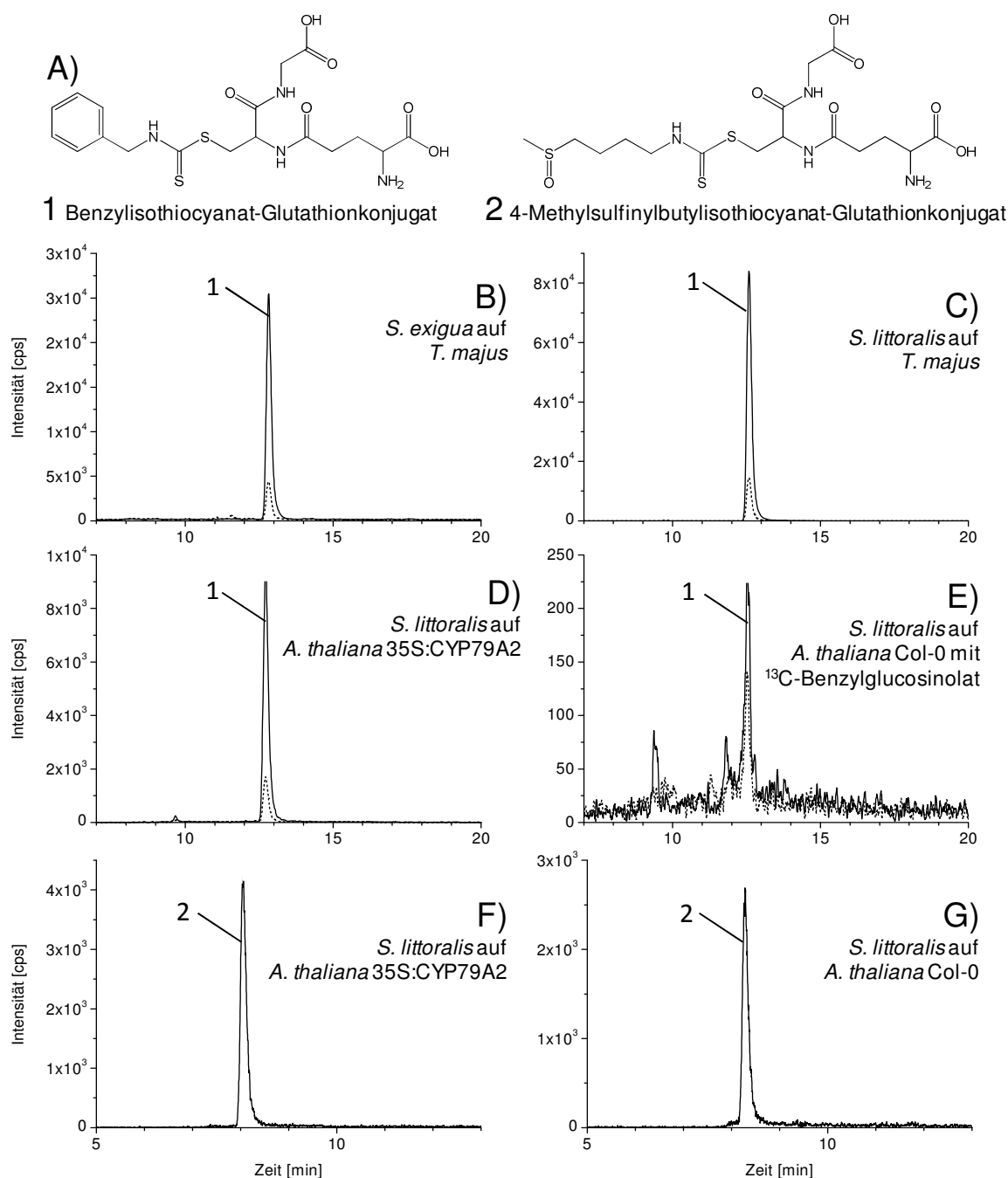


Abb. 19: Detektion von Glutathionkonjugaten zweier Isothiocyanate in Kotproben von *S. exigua* und *S. littoralis*. A) Struktur von Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat und 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat, B-G) HPLC-MS Analysen von Kotextrakten von *S. exigua* und *S. littoralis*, B-E) Detektion von Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat, F-G) Detektion von 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat. B) Kotextrakt von *S. exigua*, welchen Blättern von *T. majus* gefüttert wurden, C) Kotextrakt von *S. littoralis*, welchen *T. majus*-Blättern gefüttert wurden, D, F) Kotextrakt von *S. littoralis*, welche auf *A. thaliana* 35S:CYP79A2-Blättern fraßen, E) Kotextrakt von *S. littoralis*, welche auf *A. thaliana* Col-0-Blättern mit aufgetragenem ^{13}C -Benzylglucosinolat fraßen, G) Kotextrakt von *S. littoralis*, welche auf *A. thaliana* Col-0-Blättern fraßen. Der Kot wurde gesammelt und extrahiert, die Kotextrakte wurden massenspektrometrisch mittels MRM-Scans analysiert. Schwarze, durchgezogene Linie: entsprechendes Glutathionkonjugat; Schwarze, gestrichelte Linie: ^{13}C -Isotop, nur angegeben bei Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat.

3.2.2 Unbekannte Metabolite

Detektion einer Verbindung der Masse m/z 194 $[M+H^+]$

Im Rahmen der Detektion von Hippursäure und Phenylacetylglycin wurde eine weitere Verbindung der Masse m/z 194 $[M+H^+]$ (derselben Masse wie Phenylacetylglycin) gefunden [Abb. 17 und 18]. Die Verbindung konnte in Kotextrakten von *S. exigua* und *S. littoralis*, die auf *A. thaliana* 35S:CYP79A2 gefressen hatten, nachgewiesen werden. In Kotextrakten der Larven, die auf *A. thaliana* Col-0 gefressen hatten, war das Signal wesentlich schwächer. Die Analyse von Kotproben von *S. exigua* und *S. littoralis*, die mit ^{13}C -Benzylglucosinolat-markierten Blättern von *A. thaliana* Col-0 gefüttert wurden, ergab einen Anteil des ^{13}C -Isotopenpeaks dieser Verbindung von maximal 37 % bei *S. exigua* und maximal 39 % bei *S. littoralis*. In Kotextrakt von *S. littoralis*, die mit ^{13}C -Benzylglucosinolat-markierten *A. thaliana* SALK_072600-Blättern gefüttert wurden, lag der Anteil bei 34 %. Auch bei Vermessung von Kotproben aus Fütterungsversuchen beider Raupenarten mit *T. majus* wurde ein sehr deutliches Signal für die Verbindung erhalten. Sowohl *A. thaliana* SALK_072600 als auch *T. majus* bilden bei Gewebeverletzung nur Isothiocyanate. Die Verbindung wurde in Fraktionen von Peak 3 wiedergefunden. Die Ergebnisse aus den Fütterungsversuchen mit ^{13}C -markierten *A. thaliana* SALK_072600-Blättern und *T. majus*-Blättern decken sich mit der Zuordnung von Peak 3 zu den Metaboliten des Benzylisothiocyanats [3.1.3].

Detektion einer Verbindung der Masse m/z 346 $[M+H^+]$

Die Identifizierung der Masse des Metaboliten, der in Fütterungsversuchen mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat als Peak 4 bezeichnet wurde, erfolgte aus fraktionierten Proben durch einen Precursor Ion Scan [0]. Hierfür wurden Kotextrakte aus parallel durchgeführten Fütterungsversuchen von *S. littoralis* mit *A. thaliana* Col-0-Blättern mit ^{14}C -markiertem und ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat, sowie mit *A. thaliana* 35S:CYP79A2 fraktioniert. Als Negativkontrolle wurde Kotextrakt von *S. littoralis*, die auf *A. thaliana* Col-0 gefressen hatten, fraktioniert. Die zu Peak 4 analogen Fraktionen aus den Versuchen mit ^{13}C -markiertem bzw. unmarkiertem Benzylglucosinolat oder ohne Benzylglucosinolat (Negativkontrolle) wurden

analysiert. In der Fraktion des Fütterungsversuchs mit ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat konnte mit Precursor Ion Scan für das Fragment mit m/z 91 (Masse des Tropiliumions, Prec.1) als ein Hauptsignal ein Addukt-Ion mit m/z 346 $[\text{M}+\text{H}^+]$ ermittelt werden. Aus der gleichen Probe wurde ein Precursor Ion Scan für das Fragment mit m/z 92 (Masse des Tropiliumions mit Einbau eines ^{13}C -Atoms, Prec.2) durchgeführt. In diesem Scan konnte als Hauptsignal das ^{13}C -Isotop des Addukt-Ions mit m/z 347 $[\text{M}+\text{H}^+]$ nachgewiesen werden. Die gleichen Scans wurden mit der Fraktion aus dem Fütterungsversuch mit *A. thaliana* 35S:CYP79A2 durchgeführt. Prec.1 ergab ebenfalls ein Hauptsignal für das Addukt-Ion m/z 346 $[\text{M}+\text{H}^+]$. Prec.2 ergab kein Hauptsignal für das Addukt-Ion m/z 347 $[\text{M}+\text{H}^+]$, was durch die natürliche Isotopenverteilung bzw. die fehlende Anreicherung mit ^{13}C bedingt ist. In der Negativkontrolle waren beide Massen nicht detektierbar.

Zur Detektion des Metaboliten mit m/z 346 $[\text{M}+\text{H}^+]$ und dem ^{13}C -Isotop wurde eine MRM Methode optimiert. In Kotextrakten von *S. exigua* war der Metabolit nur bei einem Fütterungsversuch mit *T. majus*-Blättern nachweisbar [Abb. 20]. Dies war derselbe Versuch, in dem auch Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat nachgewiesen werden konnte. Bei den Analysen von Kotextrakten von *S. littoralis* ergab sich dasselbe Muster wie bei der Detektion von Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat [Abb. 19]. Die Verbindung konnte in Kotproben aus Versuchen mit *A. thaliana* Col-0 nur nachgewiesen werden, wenn in parallelen Kontrollversuchen mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat Peak 4 auftrat. In Kotextrakten aus Fütterungsversuchen mit ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat konnte ein Markierungsgrad von 40 % nachgewiesen werden. Die Verbindung mit m/z 346 $[\text{M}+\text{H}^+]$ war in Kotextrakten der beiden Fütterungsversuche mit *T. majus*-Blättern nachweisbar.

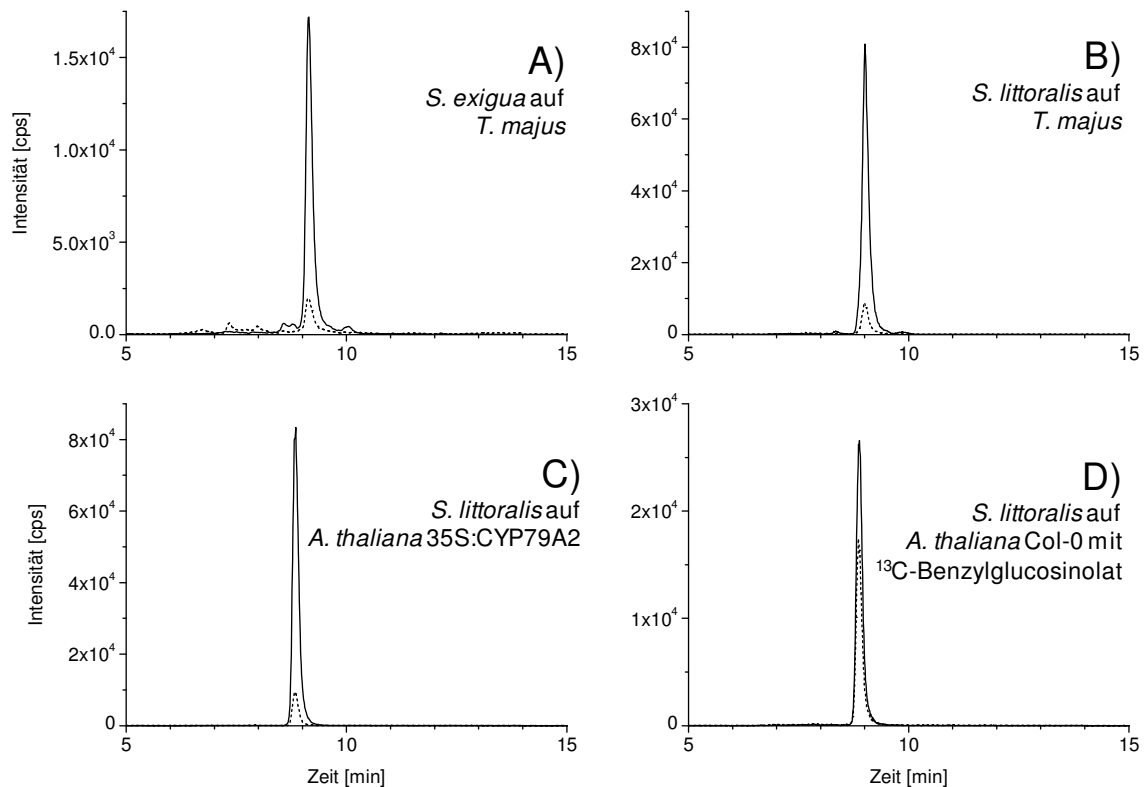


Abb. 20: Detektion eines Metaboliten mit m/z 346 $[M+H]^+$ in Kotextrakten von *S. exigua* und *S. littoralis*. A) Kotextrakt von *S. exigua*, welchen Blätter von *T. majus* verfüttert wurden, B) Kotextrakt von *S. littoralis*, welche auf Blättern von *T. majus* fraßen, C) Kotextrakt von *S. littoralis*, welche auf Blättern von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 fraßen, D) Kotextrakt von *S. littoralis*, welche auf ^{13}C -markierten *A. thaliana*-Blättern fraßen. Der Kot wurde gesammelt und extrahiert. Die Extrakte wurden massenspektrometrisch mittels MRM-Scans analysiert. Schwarze, durchgezogene Linie: Masse m/z 346 $[M+H]^+$; Schwarze, gestrichelte Linie: ^{13}C -Isotop der Verbindung, mit der Masse m/z 347 $[M+H]^+$.

3.2.3 Strukturen der unbekannten Metabolite

N-Benzylmalonaminsäure

Aus Fraktionen von Kotextrakten aus Fütterungsversuchen mit *A. thaliana* 35S:CYP79A2, die Peak 3 aus ^{14}C -Tracer-Fütterungsversuchen entsprachen, wurde die exakte Masse der Verbindung (m/z 194,08118 $[M+H]^+$) bestimmt [2.2.3]. Anhand dieser Masse wurde eine mögliche Summenformel von $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}$ mit 5,5 Doppelbindungsäquivalenten bestimmt [0]. Als mögliche Struktur wurde *N*-Benzylmalonaminsäure ermittelt. Die Substanz wurde chemisch synthetisiert und mittels NMR und HPLC-MS bestätigt. Anschließend wurde die Verbindung, sowie ein Kotextrakt, in dem der Metabolit nachweisbar war, mit der

synthetisierten *N*-Benzylmalonaminsäure als internem Standard an der HPLC-MS vermessen [Abb. 21]. Die synthetisierte *N*-Benzylmalonaminsäure und der Metabolit koeluierten. Damit wurde der Metabolit als *N*-Benzylmalonaminsäure identifiziert.

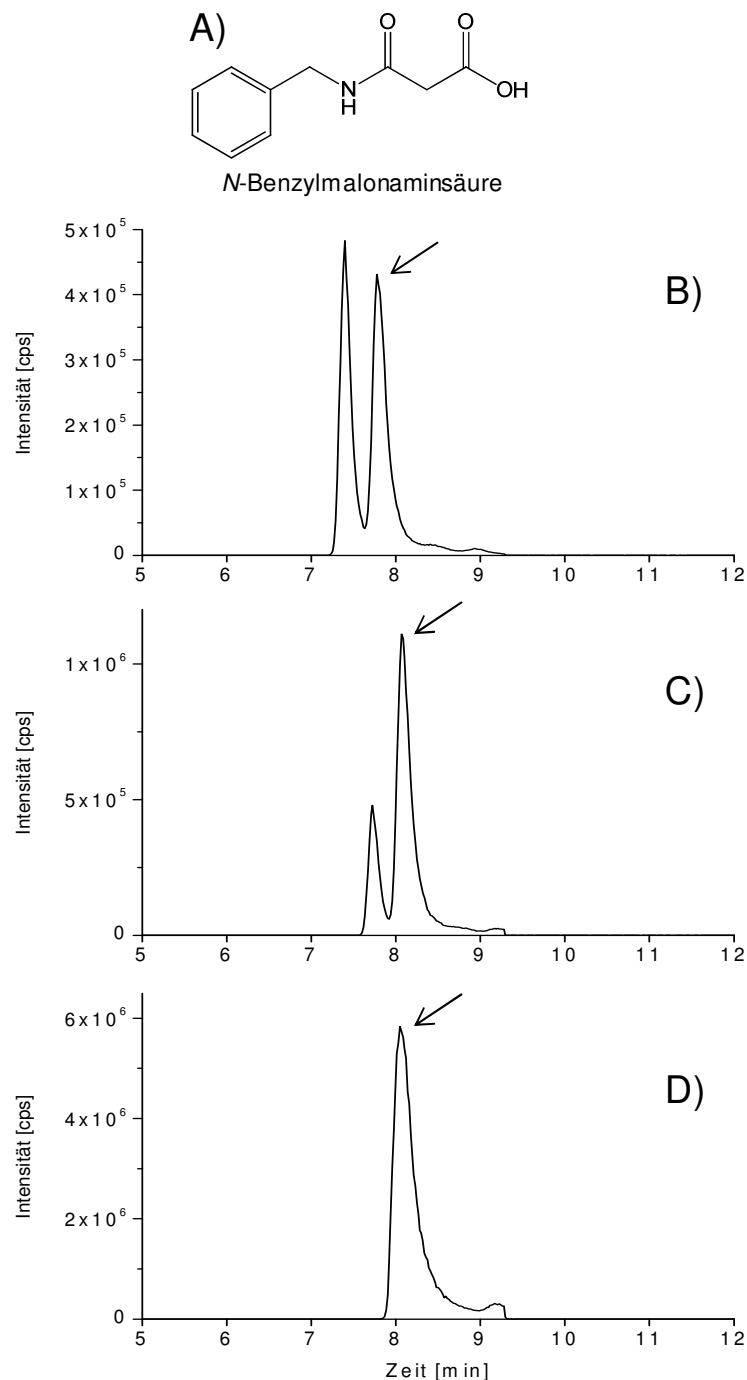


Abb. 21: Identifizierung des Metaboliten der Masse m/z 194 $[M+H]^+$ als *N*-Benzylmalonaminsäure. Anhand der exakten Masse wurde die mögliche Struktur A) des Metaboliten ermittelt. Die Verbindung wurde synthetisiert und die Struktur mittels NMR bestätigt. Der Nachweis im Kotextrakt erfolgte mittels Co-Chromatographie B-D). B) Kotextrakt von *S. exigua*, welche auf Blättern von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 fraßen, C) derselbe Kotextrakt mit zugesetzter *N*-Benzylmalonaminsäure, D) *N*-Benzylmalonaminsäure

***N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid**

Aus Fraktionen von Kotextrakten aus Fütterungsversuchen mit *A. thaliana* 35S:CYP79A2, die Peak 4 aus ^{14}C -Tracer-Fütterungsversuchen entsprachen, wurde die exakte Masse der Verbindung (m/z 346,078 $[\text{M}+\text{H}^+]$) bestimmt [2.2.3]. Für diese Masse wurden eine mögliche Summenformel von $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{NS}_2$ und 5,5 Doppelbindungsäquivalente ermittelt [2.5.2]. Als mögliche Struktur wurde *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid angenommen. Die Substanz wurde chemisch synthetisiert und mittels NMR bestätigt. Die Identität des Metaboliten als *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid wurde durch HPLC-MS bestimmt. Die Retentionszeit des *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid stimmte mit der des Metaboliten überein. Wenn *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid dem Kotextrakt zugesetzt wurde, koeluierte es mit dem Metaboliten [Abb. 22]. Damit wurde der Metabolit als *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid identifiziert.

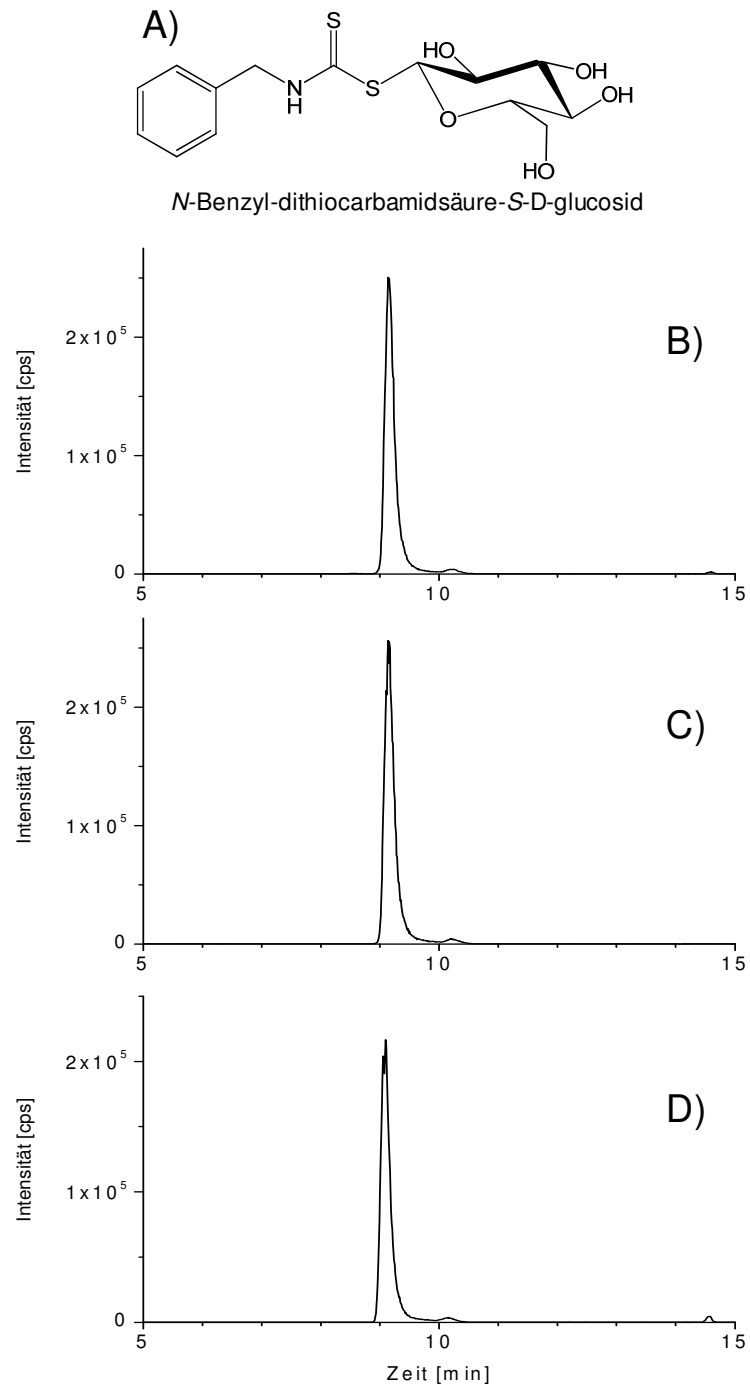


Abb. 22: Identifizierung des Metaboliten der Masse m/z 346 $[M+H]^+$ als N-Benzyl-dithiocarbamidsäure-S-D-glucosid. Der Metabolit wurde mittels Precursor Ion Scan detektiert, eine mögliche Struktur A) anhand der exakten Masse ermittelt und die Verbindung synthetisiert. Der Nachweis im Kotextrakt erfolgte mittels Co-Chromatographie B-D). B) Kotextrakt von *S. littoralis*, welche auf Blättern von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 fraßen, C) derselbe Kotextrakt mit Zusatz von N-Benzyl-dithiocarbamidsäure-S-D-glucosid, D) N-Benzyl-dithiocarbamidsäure-S-D-glucosid.

3.3 Einfluss von Darmextrakt auf Myrosinase

Da in Kotextrakten von *S. exigua* und *S. littoralis* intaktes Benzylglucosinolat nachgewiesen werden konnte, wurde der Einfluss von Darmextrakten auf die Myrosinaseaktivität untersucht, um festzustellen, ob diese eine hemmende Wirkung auf die pflanzliche Myrosinase besitzen. Extrakte aus Darmgewebe und Darminhalt der beiden Spezies wurden jeweils getrennt voneinander in Enzymassays mit gereinigter Myrosinase untersucht. Die Larven waren zuvor auf Bohnendiät gezogen worden. Feste Bestandteile des Darminhalts wurden entfernt. Die Extrakte wurden so hergestellt, dass sie jeweils das Gewebe einer Raupe pro Ansatz enthielten. Als Maß für die Myrosinaseaktivität diente die aus dem eingesetzten Substrat Allylglucosinolat durch Hydrolyse freigesetzte Glucose in nmol (min µg Protein)⁻¹. Untersucht wurden native Proben sowie Proben, die 5 min auf 95 °C erhitzt worden waren.

Bei einer eingesetzten Menge von 0,3 µg Myrosinase pro Ansatz war eine deutliche Hemmung der Myrosinase durch Zusatz von nativem Darmgewebe von *S. exigua* und *S. littoralis* nachweisbar [Abb. 23]. Die Myrosinaseaktivität ohne Zusatz von Raupengewebe betrug $5,16 \pm 0,23$ nmol (min µg Protein)⁻¹ (n = 4, SD = ± 0,23). Natives Darmgewebe von *S. exigua* verringerte die Aktivität auf 28 % (1,43 nmol (min µg Protein)⁻¹), bei Zusatz von nativem Darmgewebe von *S. littoralis* betrug die verbliebene Myrosinaseaktivität 30 % (1,54 nmol (min µg Protein)⁻¹). Darmgewebe, welches 5 min auf 95 °C erhitzt worden war, hatte einen geringen bzw. keinen hemmenden Effekt auf die Myrosinase [Abb. 23]. Auch Darminhalt zeigte eine hemmende Wirkung auf die Myrosinase. Nativer Darminhalt von *S. exigua* verringerte die Myrosinaseaktivität auf 44 % (2,27 nmol (min µg Protein)⁻¹), Darminhalt von *S. littoralis* auf 29 % (1,51 nmol (min µg Protein)⁻¹). Durch 5-minütiges Erhitzen von Darminhalten auf 95 °C wurde der hemmende Effekt auf die Myrosinase nur gering beeinflusst. Nach Zusatz von erhitztem Darminhalt von *S. exigua* betrug die Myrosinaseaktivität 45 % (2,33 nmol (min µg Protein)⁻¹). Erhitzter Darminhalt von *S. littoralis* verringerte die Myrosinaseaktivität auf 37 % (1,92 nmol (min µg Protein)⁻¹). Die Versuche wurden zusätzlich auch mit 0,15 µg und 6 µg Myrosinase pro Ansatz unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Alle Versuche wurden für beide Spezies mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

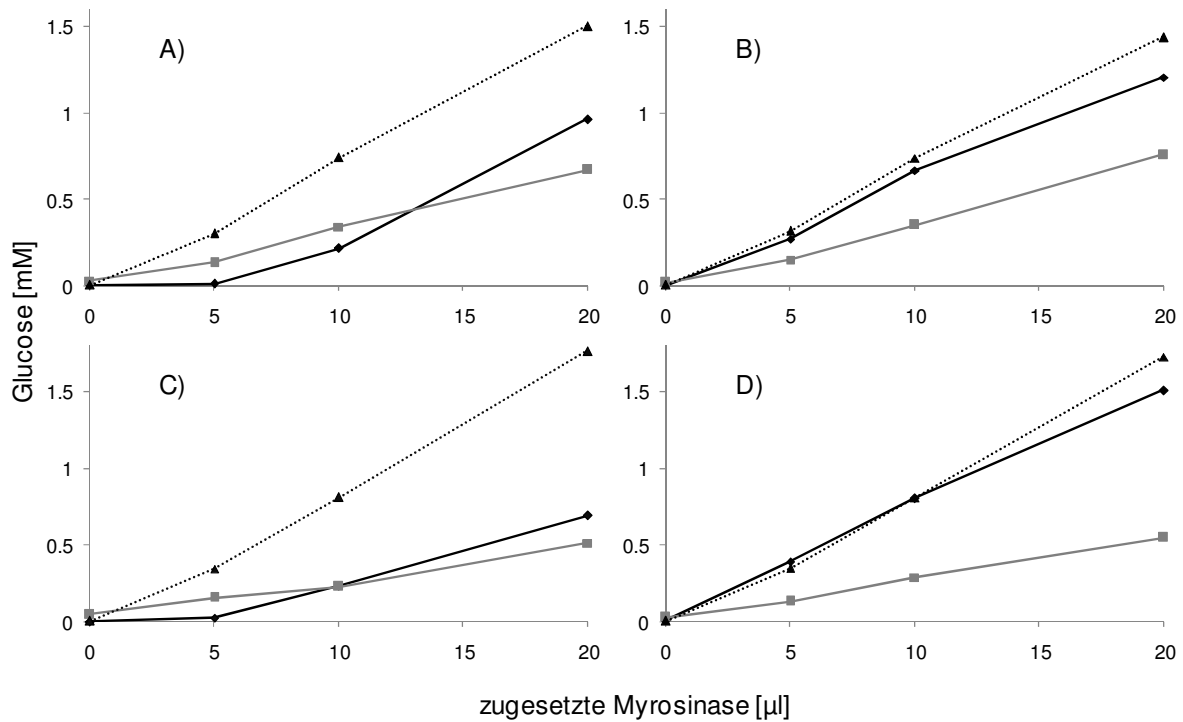


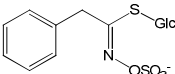
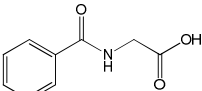
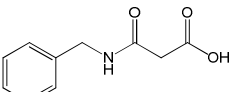
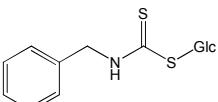
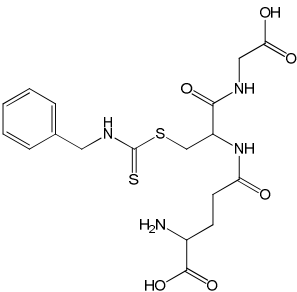
Abb. 23: Einfluß von Extrakten aus Raupendärmen oder Darminhalt von *S. exigua* und *S. littoralis* *in vitro* auf die Myrosinaseaktivität. Als Maß für die Myrosinaseaktivität diente die von der Myrosinase aus dem zugesetzten Substrat Allylglucosinolat freigesetzte Glucose. Extrakten aus Raupendärmen oder Darminhalt wurden unterschiedliche Volumina einer Myrosinaseverdünnung zugesetzt und die freigesetzte Glucosemenge bestimmt. A) Extrakt aus Darm und Darminhalt von *S. exigua*, nativ, B) Extrakt aus Darm und Darminhalt von *S. exigua*, denaturiert, C) Extrakte aus Darm und Darminhalt von *S. littoralis*, nativ, D) Extrakte aus Darm und Darminhalt von *S. littoralis*, denaturiert. Schwarze Linie entspricht Proben mit Darmextrakt, graue Linie entspricht Proben mit Darminhalt, gestrichelte Linie entspricht der Myrosinaseverdünnung ohne Zusatz von Raupenmaterial. Gezeigt ist das Ergebnis eines Einzelversuchs.

4 Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit sind die Mechanismen und Stoffwechselvorgänge, die es generalistischen Herbivoren der Lepidoptera ermöglichen auf Pflanzen zu fressen, die sich durch das Glucosinolat-Myrosinase-System u. a. gegen Fraßfeinde schützen. Die Untersuchungen wurden mit zwei Spodoptera-Arten, *Spodoptera exigua* und *Spodoptera littoralis* durchgeführt. Ziel war es, ein möglichst umfassendes Bild der Stoffwechselprozesse zu bekommen. Die gewählte Strategie war eine deduktive, ergebnisoffene Herangehensweise, das heißt, es wurde nicht versucht, bestehende Hypothesen zu beweisen. Dass diese Herangehensweise erfolgreich war, zeigt sich in der Identifizierung bisher nicht bekannter Mechanismen des Umgangs mit dem Glucosinolat-Myrosinase-System.

Es wurde zunächst die grundsätzliche Strategie der Anpassung der Lepidopteren-Larven untersucht. Dies gelang durch den Einsatz eines Radiotracers, ^{14}C -Benzylglucosinolat, der es ermöglichte, über die Radioaktivität den Verbleib des Ausgangssubstrats zu verfolgen. Festgestellt wurde die Ausscheidung der Radioaktivität mit dem Kot, wobei mehrere Produkte nachweisbar waren. Eine Sequestrierung fand nicht statt. Aufbauend auf diesen Basisinformationen wurden die Ausscheidungsprodukte dem Metabolismus der unterschiedlichen Hydrolyseprodukte des Benzylglucosinolats und dem intakten Benzylglucosinolat zugeordnet. Das erhaltene Produktmuster und die Informationen über den Ursprung der Verbindungen wurden genutzt, um diese zu identifizieren. Hierfür wurden Fraßversuche mit ^{13}C -Benzylglucosinolat und mit unmarkiertem Benzylglucosinolat durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass die Larven beider Spezies interessanterweise einen Teil des aufgenommenen Benzylglucosinolats unverändert ausscheiden. Außerdem wurde für das Hydrolyseprodukt Phenylacetonitril der von Vergara et al. (2006) bereits in *P. rapae* identifizierte Metabolit Hippursäure identifiziert. Für das Hydrolyseprodukt Benzylisothiocyanat wurde ein Metabolit identifiziert, der in Kotproben beider Arten gleichermaßen enthalten war. Dabei handelte es sich um *N*-Benzylmalonaminsäure. Zusätzlich wurden, besonders in Proben von *S. littoralis*, *N*-Benzylthiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid und das Glutathionkonjugat des Benzylisothiocyanats nachgewiesen. In [Tab. 17] ist eine Übersicht der durchgeführten Fraßversuche und Ausscheidungsprodukte zu finden.

Tab. 17: Ausscheidungsprodukte nach Verfütterung von Benzylglucosinolat an Larven von *S. exigua* und *S. littoralis*. Angegeben ist, welcher pflanzlichen Verbindung die Ausscheidungsprodukte zuzuordnen sind (1. dem nicht hydrolysierten Benzylglucosinolat, 2. Phenylacetoneitril, 3. Benzylisothiocyanat) und welcher Versuchsaufbau zum Nachweis eingesetzt wurde. Die Versuche wurden mit Raupen beider Arten durchgeführt, ^a Versuch wurden nur mit *S. littoralis* durchgeführt.

	Ausscheidungsprodukte	Versuche zum Metabolitenmuster, Pflanzen bzw. Diät mit aufgetragenem ¹⁴ C-Benzylglucosinolat	Versuche zur Strukturaufklärung, Pflanzen mit aufgetragenem ¹³ C-Benzylglucosinolat oder endogenem Benzylglucosinolat
1	 Benzylglucosinolat	<i>A. thaliana</i> Col-0 <i>A. thaliana</i> SALK_072600 ^a <i>T. majus</i> Kunstdiät Peak 1 des Metabolitenmusters	mit ¹³ C-Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> Col-0 endogenes Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> 35S:CYP79A2 <i>T. majus</i>
2	 Hippursäure	<i>A. thaliana</i> Col-0 Peak 2 des Metabolitenmusters	mit ¹³ C-Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> Col-0 endogenes Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> 35S:CYP79A2
3	 <i>N</i> -Benzylmalonaminsäure	<i>A. thaliana</i> Col-0 <i>A. thaliana</i> SALK_072600 ^a <i>T. majus</i> Peak 3 des Metabolitenmusters	mit ¹³ C-Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> Col-0 endogenes Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> 35S:CYP79A2 <i>A. thaliana</i> SALK_072600 ^a <i>T. majus</i>
	 <i>N</i> -Benzyl-dithiocarbamidsäure-S-D-glucosid	<i>A. thaliana</i> Col-0 <i>A. thaliana</i> SALK_072600 ^a <i>T. majus</i> Peak 4 des Metabolitenmusters	mit ¹³ C-Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> Col-0 endogenes Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> 35S:CYP79A2 <i>A. thaliana</i> SALK_072600 ^a <i>T. majus</i>
	 Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat	In Fraßversuchen mit Tracer keinem Peak zuzuordnen	mit ¹³ C-Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> Col-0 endogenes Benzylglucosinolat: <i>A. thaliana</i> 35S:CYP79A2 <i>T. majus</i>

4.1 Transgene Pflanzen und isotopenmarkierte Tracer als Werkzeuge

Das Glucosinolat-Myrosinase-System ist bezogen auf seine experimentelle Untersuchung ein recht anspruchsvolles Abwehrsystem. Der mehrphasige Aufbau und die Justierungsmöglichkeiten der einzelnen Phasen seitens der Pflanze machen die Untersuchung der Anpassungsmechanismen herbivorer Lepidopteren kompliziert. Die Wechselwirkungen und Stoffwechselprozesse, wie sie unter natürlichen Bedingungen stattfinden, lassen sich letztendlich nur durch Fraßversuche mit Pflanzen klären, da ein Nachbau des Glucosinolat-Myrosinase-Systems z. B. mit künstlicher Diät nicht realisierbar ist. So wurde auch der Anpassungsmechanismus von *P. rapae*, das NSP, durch Fütterungsversuche mit intakten Pflanzen aufgeklärt (Wittstock et al., 2004). Die zuvor gemachten Untersuchungen mit Isothiocyanaten zeigten zwar deutlich deren Toxizität für den Spezialisten *P. rapae*, vernachlässigten aber die Möglichkeit, dass die Raupen durch spezifische Anpassungen die Isothiocyanat-Bildung blockieren und dadurch gar nicht in Kontakt mit größeren Mengen Isothiocyanat kommen könnten (Agrawal und Kurashige, 2003).

Das Glucosinolat-Myrosinase-System ist mittlerweile sehr gut erforscht, die meisten Enzyme und Gene der Glucosinolatbiosynthese sind bekannt und transgene Pflanzen mit gezielten Veränderungen in Glucosinolat- und Hydrolyseproduktprofil sind erhältlich (Wittstock und Halkier, 2002; Halkier und Gershenzon, 2006; Benderoth et al., 2009; Sønderby et al., 2010; Wittstock und Burow, 2010)). In der vorliegenden Arbeit wurden die Linien der transgenen *A. thaliana* 35S:CYP79A2 und SALK_072600 verwendet. Die Arabidopsis-Mutante 35S:CYP79A2 synthetisiert konstitutiv Benzylglucosinolat (Wittstock und Halkier, 2000) und wurde zur Herstellung der Tracer und zur direkten Verfütterung genutzt. Reguliert durch den CaMV35S-Promotor exprimiert sie das Cytochrom P450 CYP79A2, welches die *N*-Hydroxylierung von L-Phenylalanin zu Phenylacetaldoxim katalysiert, einer Vorstufe des Benzylglucosinolats. Durch die konstitutive Aktivität von CYP79A2 konnte bei Aufnahme von ^{14}C -markiertem bzw. ^{13}C -markiertem Phenylalanin von Blättern der Pflanze ^{13}C - bzw. ^{14}C -Benzylglucosinolat mit hohem Markierungsgrad bzw. hoher spezifischer Aktivität isoliert werden. Das isolierte, isotopenmarkierte Glucosinolat wurde dann auf Blätter von *A. thaliana* Col-0 aufgebracht, so dass es

bei Aufnahme der Blätter durch die Larven wie die endogenen Glucosinolate verstoffwechselt wird. Diese Methodik wurde bereits erfolgreich in anderen Studien eingesetzt (Wittstock et al., 2004; Müller und Wittstock, 2005; Vergara et al., 2006).

Für die hier angefertigten Untersuchungen wurde Benzylglucosinolat als Modellsubstrat ausgewählt, da es stabil und gut zu isolieren ist und ^{14}C -markiertes und ^{13}C -markiertes Phenylalanin als Vorstufen relativ kostengünstig erhältlich sind. In der Analytik kommt außerdem positiv zum Tragen, dass der Benzylrest in der Massenspektrometrie als ein Fragment mit m/z 91 detektiert werden kann. Dies kann wiederum genutzt werden, um die Mutterionen, aus denen das Fragment abgespalten wurde, zu identifizieren, was in diesem Fall zur Identifizierung der unbekannten Metabolite genutzt werden konnte. Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, dass mit den 35S:CYP79A2-Linien Pflanzen zur Verfügung standen, die sich vom Wildtyp äußerlich kaum unterscheiden, aber Benzylglucosinolat als zusätzliches Glucosinolat enthalten.

Die zweite eingesetzte Arabidopsis-Mutante, *A. thaliana* SALK_072600, setzt, im Gegensatz zu Wildtyp *A. thaliana* Col-0, bei Gewebeverletzung nur Spuren oder gar keine Nitrile aus Glucosinolaten frei. *A. thaliana* SALK_072600 wurde in Fraßversuchen eingesetzt, die der Zuordnung der Metabolite zum Hydrolyseprodukt Benzylisothiocyanat dienten.

4.2 Sequestrierung und/oder Metabolismus und Ausscheidung?

Sequestrierung von Sekundärstoffen durch herbivore Insekten geht häufig mit der Nutzung dieser Stoffe für die insekteneigene Abwehr einher. Sequestrierende Insekten zeigen häufig durch eine ausgeprägte Warnfärbung (Aposematismus) ihre Giftigkeit. So sequestrieren z. B. die schwarz-gelb gefärbten Larven von *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera: Noctuidae) toxische Pyrrolizidinalkaloide und speichern diese in ihrer Haemolymphe, was sie ihrerseits toxisch für Fraßfeinde wie Vögel macht (Lindigkeit et al., 1997). Ein weiterer Effekt, der zusammen mit der Sequestrierung von Sekundärstoffen und deren Speicherung in der Haemolymphe beobachtet werden kann, ist das Easy-Bleeding, wie es z. B. *Athalia rosae* zeigt (Müller et al., 2001; Opitz et al., 2010). Beim Easy-Bleeding wird das sehr weiche

Integument des Insekts bereits bei geringen Berührungen verletzt und es tritt ein Tropfen Haemolympe mit den gespeicherten Abwehrstoffen aus. Beide Phänomene, Aposematismus und Easy-Bleeding, sind bei den in dieser Arbeit untersuchten Larven nicht zu finden.

In mehreren Versuchen konnte für keinen der untersuchten Generalisten (*S. exigua*, *S. littoralis*, *T. ni*) die Sequestrierung von Glucosinolaten oder deren Derivaten nachgewiesen werden. Fütterungsversuche mit Tracern zeigten die Ausscheidung mit dem Kot. Alle Larven schieden den größten Teil der Radioaktivität als wasserlösliche Verbindungen aus (77-88 % der wiedergefundenen Radioaktivität) und einen weniger großen Teil als lipophile Substanzen (10-19 % der wiedergefundenen Radioaktivität). Eine Anreicherung oder Sequestrierung fand nicht statt, was der geringe Anteil an Radioaktivität in den Körpern zeigte (2-4 % der wiedergefundenen Radioaktivität).

Die Wiederfindungsrate der eingesetzten Radioaktivität war in den Fraßversuchen relativ gering (26-30 %). In vorgeschalteten Versuchen zur Stabilität des Radiotracers im Versuchsaufbau lag die Wiederfindungsrate höher. In diesen Versuchen konnte aus markierten, aber nicht befressenen Blättern 48 % der eingesetzten Radioaktivität zurück extrahiert werden. Eine Erklärung für die geringere Wiederfindungsrate in den Fraßversuchen könnte die Hydrolyse des Radiotracers zu flüchtigen Produkten an den Fraßkanten der markierten Blätter sein, zu der es in den Futterpausen der Raupen kommen könnte. Die Raupen befraßen die Blätter unregelmäßig, z. B. fraßen sie häufig mehrere Löcher in die Blätter. Dadurch entstanden relativ viele Fraßkanten, an denen die Myrosinase und ^{14}C -Benzylglucosinolat während der Futterpausen in Kontakt kommen konnten. Ein unregelmäßiger, löchriger Fraß wurde auch bei Larven von *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) auf *A. thaliana*-Blättern beobachtet und mit der Verteilung der Glucosinolate innerhalb des Blattes in Verbindung gebracht (Shroff et al., 2008). Es wird vermutet, dass *H. armigera* durch dieses Fraßverhalten den Verzehr von Blattpartien mit hohem Glucosinolatgehalt vermeidet. Dies könnte auch eine Erklärung für das Fraßverhalten von *S. exigua*, *S. littoralis* und *T. ni* sein, dem konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen werden. Ein weiterer Grund für die geringe Wiederfindungsrate könnte die Ausscheidung flüchtiger Hydrolyseprodukte der Glucosinolate mit dem Kot sein, die während der Aufarbeitung des Kots entweichen. Flüchtige Glucosinolathydrolyseprodukte sind im Kot verschiedener generalistischer

Lepidopterenlarven nachgewiesen worden (K. Schramm, persönliche Mitteilung). Für die Versuche dieser Arbeit hieße dies, dass Fütterungsversuche mit dem Radiotracer keine exakte Quantifizierung der metabolischen Prozesse ermöglichen. Aussagen zur qualitativen Zusammensetzung des Metabolitenmusters waren aber möglich. Festgestellt wurde die Ausscheidung von drei Metaboliten sowie von intaktem Benzylglucosinolat. Die neben Benzylglucosinolat (Peak 1) ausgeschiedenen Metabolite wurden als Hippursäure (Peak 2), *N*-Benzylmalonaminsäure (Peak 3) und *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid (Peak 4) identifiziert. Zur Zusammensetzung des Metabolitenmusters wurden verschiedene Optimierungsversuche mit *S. exigua* durchgeführt. Auf die qualitative Zusammensetzung der Ausscheidungsprodukte hatten Variationen im Versuchsaufbau wie Applikationsart des Radiotracers oder Lagerung des Kots vor der Extraktion keinen Einfluss.

Trotzdem kam es in weiteren Versuchen neben quantitativen Schwankungen in der Zusammensetzung des Metabolitenmusters auch zu qualitativen Änderungen. So war *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid in einigen Proben nicht nachweisbar. Einziger Unterschied zu den zuvor durchgeführten Fraßversuchen war, dass jeglicher angetrockneter Kot vor der Extraktion aussortiert wurde. Da zuvor kein Einfluss der Lagerung/Trocknung auf das Metabolitenmuster festgestellt wurde, ist davon auszugehen, dass die Metabolite im Kot stabil sind. Gänzlich ausgeschlossen werden können Reaktionen der Metabolite im Kot aber nicht. Während der Optimierungsversuche betrug die längste Verweildauer des Kots bei Raumtemperatur 8 h. Diese Zeit wurde dann auf 4 h reduziert, in dieser Zeit kam es zu keiner wesentlichen Trocknung des Kots. Eine alternative Erklärung können externe Einflüsse auf die Raupen sein. Da die Gelege per Post geschickt wurden, waren sie während des Transportes den aktuellen Umwelttemperaturen ausgesetzt. Dies bewirkte z. B., dass sich die Larven im Winter trotz konstanter Zuchtbedingungen schlechter entwickelten. Dies betraf insbesondere *S. exigua*. Möglicherweise wurde auch der Stoffwechsel der Glucosinolate bzw. ihrer Hydrolyseprodukte in den Raupen durch diese Bedingungen beeinflusst.

Um Schwankungen im Metabolitenmuster berücksichtigen zu können, wurden für die weiteren Fraßversuche mit ^{13}C -markiertem bzw. unmarkiertem Benzylglucosinolat zur Strukturaufklärung grundsätzlich parallel Fraßversuche mit ^{14}C -markiertem Benzylglucosinolat durchgeführt.

4.3 Ausscheidung von intaktem Benzylglucosinolat

Sowohl im Kot von *S. exigua* als auch von *S. littoralis* war intaktes Benzylglucosinolat enthalten. In Radiotracerversuchen betrug der Anteil an Benzylglucosinolat ca. 1/4 bis 1/3 der Ausscheidungsprodukte. Dies ist insofern erstaunlich, da zuvor von einer vollständigen Hydrolyse des aufgenommenen Glucosinolats durch die ebenfalls aufgenommene Myrosinase ausgegangen wurde. Beide Larven ernähren sich kauend, was die Aktivierung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems bedingen sollte. Die Ausscheidung intakten Glucosinolats wurde bisher nur für Blattläuse, also saugende Herbivoren, gezeigt (Kazana et al., 2007). Für kauende Herbivoren sind bislang zwei Anpassungsmechanismen bekannt, die die Myrosinase-katalysierte Hydrolyse der Glucosinolate verhindern: die Glucosinolatsulfatase (Ratzka et al., 2002) und die schnelle Sequestrierung (Müller et al., 2001). Auch in diesen Fällen kommt es zur Ausscheidung von Metaboliten, eine Ausscheidung von intaktem Glucosinolat mit dem Kot ist bisher noch nicht beschrieben worden. Keine der bisherigen Studien gibt Anlass zu der Annahme, dass es im Rahmen des Fraßes von kauenden Herbivoren, ohne weitere Anpassungsmechanismen wie Glucosinolatsulfatase oder Sequestrierung, nicht zu einer vollständigen Hydrolyse der im gefressenen Blattmaterial enthaltenden Glucosinolate kommen könnte. Vielmehr handelt es sich besonders bei den Anpassungen, die auf Ebene der Glucosinolate ansetzen, um sehr effektive Mechanismen zur Vermeidung der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse der Glucosinolate.

Der Nachweis von intaktem Benzylglucosinolat im Kot von *S. exigua* und *S. littoralis* könnte ein Hinweis auf eine bisher nicht bekannte Anpassungsstrategie dieser Herbivoren an das Glucosinolat-Myrosinase-System auf Ebene der Glucosinolate durch eine Hemmung der Myrosinase sein. Da die neben intaktem Benzylglucosinolat in Kotproben enthaltenen weiteren Metabolite eindeutig den Hydrolyseprodukten zugeordnet werden konnten, liegt keine vollständige Hemmung der Myrosinase vor. Um diesem Befund weiter nachzugehen wurden Darmgewebe und Darminhalt (flüssige Bestandteile) der beiden Spezies auf eine hemmende Wirkung auf Myrosinase untersucht. Dazu wurden Larven auf künstlicher Diät herangezogen. Darmgewebe und Darminhalt wurden gewonnen und Myrosinaseassays mit und ohne Zusatz der Präparationen des Darmgewebes und

des Darminhaltes durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse untermauern die Hinweise darauf, dass es bei Aufnahme von Glucosinolat- und Myrosinase-haltigem Pflanzenmaterial durch *S. exigua* und *S. littoralis* zu einer Hemmung der Myrosinase kommt [Abb. 23]. Die Präparationen von Darmgewebe beider Arten hatten einen deutlich hemmenden Effekt auf die Myrosinase (Reduktion der Aktivität auf 28 % bzw. 30 %), ebenso die Präparationen des Darminhalts (Reduktion der Aktivität auf 44 % bzw. 29 %). Denaturierte Proben zeigten uneinheitliche Effekte auf die Myrosinase. Die Darmpräparationen sowohl von *S. exigua* als auch von *S. littoralis* hatten nach Denaturierung nur noch einen geringen oder keinen hemmenden Effekt. Auf die Wirkung des Darminhalts beider Arten hatte die Denaturierung dagegen kaum einen Einfluß. Besonders die unterschiedlichen Ergebnisse für Darmgewebe und Darminhalt nach der Denaturierung machen eine Interpretation der Daten schwierig. Ein reiner pH-Effekt kann ausgeschlossen werden, da Myrosinase für ihr breites pH-Optimum bekannt ist (Maike Lübbecke, persönliche Mitteilung). Eine weitere Aufreinigung der Proben würde exaktere Aussagen zulassen und könnte so weiterführende Ergebnisse zur Natur des Hemmstoffes oder der Hemmstoffe liefern. Außerdem sollten Darmpräparationen eines kauenden Herbivoren mit bekannter Anpassung, z. B. *P. rapae*, zum Vergleich herangezogen werden. Eine weitere interessante Frage ist, wie spezifisch die Hemmung für Myrosinase im Vergleich mit anderen Glucosidasen ist. Diesbezügliche Daten würden ein klareres Bild über Ausmaß und Bedeutung der Myrosinasehemmung als Anpassungsstrategie im ökologischen Kontext liefern.

4.4 *N*-Benzylmalonaminsäure als Entgiftungsprodukt von Benzylisothiocyanat

N-Benzylmalonaminsäure ist ein Metabolit, der bisher nicht im Zusammenhang mit der Metabolisierung von Glucosinolaten und deren Hydrolyseprodukten beschrieben wurde. *N*-Benzylmalonaminsäure war in Kotproben von *S. exigua* und *S. littoralis* enthalten und entstand bei der Metabolisierung von Benzylisothiocyanat. Der Markierungsgrad in Fraßversuchen mit ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat und *A. thaliana* Col-0 entsprach dem des eingesetzten Glucosinolats oder lag knapp darunter (39 % im Metaboliten, 41 % im Benzylglucosinolat). Daraus kann geschlossen werden, dass Benzylisothiocyanat die Hauptquelle für *N*-Benzylmalonaminsäure darstellt. Für den Reaktionsweg vom Benzylisothiocyanat zur *N*-Benzylmalonaminsäure darf vermutet werden, dass das Benzylisothiocyanat zunächst zum Benzylamin umgesetzt wird [Abb. 24]. Die Bildung von Benzylamin aus Benzylisothiocyanat in einem biologischen System wurde bereits nachgewiesen (Lee, 1996; Goosen et al., 2001). Bei der Inkubation von gereinigtem Cytochrom P450 2B1 aus Rattenmikrosomen mit Benzylisothiocyanat war Benzylamin der Hauptmetabolit (Goosen et al., 2001). Die Entstehung des Benzylamins verläuft vermutlich über Oxidation und Abspaltung des Schwefelatoms zum Benzylisocyanat [Abb. 24]. Benzylisocyanat ist instabil und hochreaktiv und hydrolysiert unter Abgabe von CO_2 zum Amin. Die Bildung von Isocyanaten aus Benzylisothiocyanat und 2-Naphthylisothiocyanat durch Inkubation mit Mikrosomen aus Rattenleber wurde ebenfalls bereits nachgewiesen (Lee, 1992 u. 1996). Unter Berücksichtigung dieser Reaktionsfolge könnte der in Radiochromatogrammen nachgewiesene, aber nicht als Hauptmetabolit klassifizierte Peak 5 evtl. auf weitere Reaktionen des Isocyanats zurückgeführt werden. Auch in anderen Insekten der Lepidoptera gibt es Hinweise auf die Beteiligung oxidativer Prozesse an der Isothiocyanat- bzw. Hydrolyseproduktentgiftung. Mikrosomen aus Raupendärmen von *S. frugiperda* wurden mit 2-Phenylethylisothiocyanat oder zwei weiteren Hydrolyseprodukten inkubiert. In den Reaktionsansätzen konnte eine zeitabhängige Oxidation von NADPH, die durch CO inhibierbar war, nachgewiesen werden (Yu, 1987).

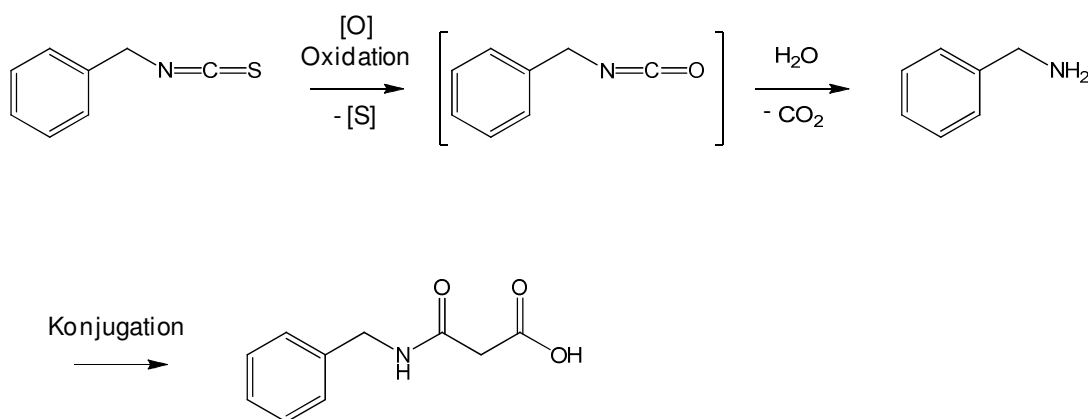


Abb. 24: Schematische Darstellung des vermuteten Reaktionsweges der Bildung der *N*-Benzylmalonaminsäure. Benzylisothiocyanat wird zu Benzylisocyanat oxidiert, dieses ist in wässrigem Milieu instabil und zerfällt unter Decarboxylierung zum Benzylamin. Der letzte Schritt ist die Konjugation mit Malonsäure zu *N*-Benzylmalonaminsäure, die mit dem Kot ausgeschieden wird.

Verwunderlicher ist der nächste für die Metabolitenbildung nötige Schritt, die Konjugation des Benzylamins mit Malonsäure [Abb. 24]. Eine solche Reaktion ist für Tiere bis jetzt nicht beschrieben worden. In verschiedenen Pflanzen sind die Bildung von *N*-Malonsäurekonjugaten als Entgiftungsprodukte und die dafür verantwortlichen Enzyme, *N*-Malonyltransferasen, bereits untersucht worden (Matern et al., 1984; Sandermann et al., 1991; Schmidt et al., 1994). Ob bei unseren Versuchen pflanzliche Enzyme an der Metabolitenbildung in der Larve beteiligt sein könnten, ist unklar. In einer Studie von Lao et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass 3,4-Dichloroanilin von *A. thaliana* als *O*-Glycosid entgiftet wird, wohingegen es von Sojabohnen, *Glycine max*, zum *N*-Malonat umgesetzt wird. Dies spricht zunächst gegen eine Beteiligung pflanzlicher *N*-Malonyltransferasen an dem von uns beschriebenen Reaktionsweg, da unsere Versuche größtenteils mit *A. thaliana* durchgeführt wurden. Auch muss eine spontane Reaktion von Malonsäure und Benzylamin während der Verdauung in Betracht gezogen werden.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu identifizierte Metabolit *N*-Benzylmalonaminsäure war in allen Versuchsanordnungen deutlich und konstant detektierbar. Daraus kann geschlossen werden, dass für *S. exigua* und *S. littoralis* oxidative Prozesse eine wichtige Rolle für den Abbau der Isothiocyanate spielen. Die Versuche mit *T. ni* deuten an, dass auch hier *N*-Benzylmalonaminsäure gebildet wird. Deshalb wäre die Untersuchung von weiteren Raupen herbivorer

Generalisten der Lepidoptera interessant. Ebenso interessant wäre die Klärung der Frage, ob es bei Isothiocyanaten anderer Struktur ebenfalls zu einem Abbau über die Bildung des jeweiligen Amins kommt. Aus diesen Ergebnissen ließen sich Rückschlüsse darauf ziehen, ob diese allgemeinen Entgiftungsreaktionen eine wesentliche Rolle in der Anpassung von Generalisten an das Glucosinolat-Myrosinase-System und die Entgiftung der Isothiocyanate im Besonderen spielen.

4.5 *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid – Ein Produkt aus Benzylglucosinolat und Benzylisothiocyanat?

Ein weiterer im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierter Metabolit ist das *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid. Diese Verbindung hat ihren Ursprung im Benzylisothiocyanat und konnte Peak 4 der Radiochromatogramme zugeordnet werden. Im Gegensatz zu den anderen Ausscheidungsprodukten konnte *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid nicht in allen Versuchen detektiert werden. Im Kot von *S. littoralis*, die auf *T. majus* gefressen hatten, war die Verbindung allerdings immer nachweisbar (drei Versuche). Bei Fütterung von *A. thaliana* Col-0-Blättern mit dem Radiotracer an *S. littoralis* wurden uneinheitliche Ergebnisse erzielt. In zwei von vier Versuchen war *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid ein Hauptmetabolit, in zwei Versuchen war die Verbindung nicht nachweisbar. Für *S. exigua* fielen die Ergebnisse nach der Versuchsoptimierung eindeutiger aus. Wenn *S. exigua* auf mit ^{14}C -Benzylglucosinolat behandelten *A. thaliana* Col-0-Blättern gefressen hatten, war nur noch sehr wenig oder kein *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid nachweisbar. In einem Fraßversuch mit *S. littoralis* und ^{13}C -Benzylglucosinolat auf Blättern von *A. thaliana* Col-0 konnte aber gezeigt werden, dass das *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid ein spezifisches Produkt der Umsetzung dieses Glucosinolats ist. Nicht geklärt werden konnte bisher, ob neben dem Dithiocarbamidsäureteil auch der Glucosidrest aus dem Benzylglucosinolat stammt. *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid entsteht vermutlich nicht durch Stoffwechselprozesse in der Larve, sondern durch Reaktion des

Benzylisothiocyanats mit intaktem Glucosinolat. Wie kann es zur Bildung dieser Struktur im Rahmen der Hydrolyse kommen? Wenn es, wie unter 4.2 beschrieben, im Darm der Larven zu einer Hemmung der Myrosinase kommt und die Kapazität anderer Entgiftungsreaktionen für Benzylisothiocyanat erschöpft ist, könnten Isothiocyanat und intaktes Glucosinolat im Darm oder im Kot über einen längeren Zeitraum nebeneinander vorliegen. Dies könnte eine Reaktion möglich machen. Auch das sporadische Auftreten des *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosids ließe sich so erklären.

Die Beantwortung der Frage, ob der Zucker und/oder der Schwefel des *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid tatsächlich von Glucosinolaten stammen, ist für die Klärung der Reaktion wichtig, ebenso wie Untersuchungen zur Frage, ob Benzylisothiocyanat und Benzylglucosinolat unter den Bedingungen im Darm oder Kot spontan reagieren können.

4.6 Hippursäure als Metabolit von Phenylacetonitril

Für beide untersuchten Lepidopterenlarven, *S. exigua* und *S. littoralis*, konnte Hippursäure als Metabolit des Phenylacetonitrils nachgewiesen werden. Hippursäure ist bereits in *P. rapae* in Fütterungsversuchen mit isotoopenmarkiertem Benzylglucosinolat als Hauptmetabolit des Phenylacetonitrils identifiziert worden (Vergara et al., 2006 und 2007). In *P. rapae* entsteht es als Metabolit des durch das NSP der Larven gebildeten Phenylacetonitrils. Im Gegensatz dazu ist Hippursäure in *S. exigua* und *S. littoralis* ein Metabolit des bereits im aufgenommenen Pflanzenmaterial gebildeten Phenylacetonitrils. Für *P. rapae* wurden neben der Hippursäure noch die Nebenmetabolite des Phenylacetonitrils, Phenylacetylglycin und *N*-Benzoylisoserin, gefunden (Vergara et al., 2006 und 2007). Phenylacetylglycin ist zwar im Kot von *S. exigua* und *S. littoralis* enthalten, stammt aber aus anderen Stoffwechselprozessen, was durch Einsatz isotoopenmarkierter Tracer gezeigt werden konnte. Der Reaktionsweg vom Phenylacetonitril zur Hippursäure ist für *P. rapae* noch nicht bekannt. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie es in *S. exigua* und *S. littoralis* zur Bildung der Hippursäure kommt. Denkbar wäre zunächst eine Hydrolyse des Nitrils zur

Carbonsäure, möglicherweise katalysiert durch pflanzliche Nitrilasen, die mit dem Blattmaterial durch die Raupen aufgenommen werden. Für Larven von *P. rapae* konnte in Fraßversuchen mit künstlicher Diät, welche Nitrile enthielt, so gut wie keine Hydrolyse von Nitrilen zu den entsprechenden Carbonsäuren gezeigt werden, was für die Beteiligung pflanzlicher Nitrilasen spricht (Agerbirk et al., 2010). Im Anschluss müsste es zur Kettenverkürzung um ein C-Atom kommen. Die entstehende Benzoesäure würde dann mit Glycin konjugiert und ausgeschieden werden. Wie bei *P. rapae* wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für *S. exigua* und *S. littoralis* gezeigt, dass die Hippursäure nicht einzig aus der Metabolisierung des Phenylacetonitrils stammt, sondern auch aus anderen Stoffwechselwegen. Hippursäure war auch im Kot der beiden Arten nach Fraß auf *A. thaliana* Col-0, die kein Benzylglucosinolat enthalten, oder nach Fraß auf *T. majus*, die nur Isothiocyanate bilden, nachweisbar. Dass ein Teil der Hippursäure aus der Metabolisierung des Phenylacetonitrils stammt, demonstrierten Fraßversuchen mit ^{13}C -markiertem Benzylglucosinolat. Sowohl im Kot von *S. exigua* als auch in dem von *S. littoralis* war der Anteil des ^{13}C -Isotops der Hippursäure erhöht (29 % bzw. 17 %). Auch auf Grund dieser Parallele zwischen den beiden hier untersuchten Generalisten und dem Spezialisten *P. rapae* wäre eine Aufklärung der metabolischen Prozesse, die hinter der Bildung der Hippursäure stehen, von großem Interesse.

4.7 Konjugation mit Glutathion – ein Nebenweg der Entgiftung von Isothiocyanaten?

Da ältere Studien eine Entgiftung von Isothiocyanaten über die Konjugation mit Glutathion postuliert hatten und einige experimentelle Hinweise auf die Beteiligung dieses Reaktionsweges aus der Literatur vorlagen (Wadleigh und Yu, 1988), wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit Kotproben von *S. exigua* und *S. littoralis* auf die Konjugate zweier Isothiocyanate hin untersucht. Neben Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat wurde zusätzlich auf das Glutathionkonjugat des 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat getestet. Die korrespondierenden Glucosinolate kommen in den von uns verwendeten Futterpflanzen vor: 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat ist das Hauptglucosinolat von *A. thaliana* Col-0, in

A. thaliana 35S:CYP79A2 ist es neben dem Hauptglucosinolat Benzylglucosinolat in zweitgrößter Menge enthalten. Erstaunlicherweise korrelierte die Detektierbarkeit der Glutathionkonjugate in den HPLC-MS Analysen genau mit der Detektierbarkeit des *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-S-D-glucosids. Sie unterlag denselben Schwankungen. Dementsprechend war Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat konstant nur in Kotproben von *S. littoralis*, die auf *T. majus* gefressen hatten, detektierbar. Über den Markierungsgrad konnte in einem Fraßversuch mit ^{13}C -Benzylglucosinolat auf *A. thaliana* Col-0 und *S. littoralis* gezeigt werden, dass das Konjugat aus dem Tracer hervorgegangen war. 4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat-Glutathionkonjugat war in Kotproben beider Arten nach Fraß von *A. thaliana* 35S:CYP79A2 ebenfalls nur nachweisbar, wenn *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-S-D-glucosid in der gleichen Probe gefunden wurde, oder in Kotproben, die aus parallel durchgeführten Kontrollversuchen mit *A. thaliana*-Col-0 stammten. Glutathionkonjugate wurden also offenbar unabhängig von der Struktur der Isothiocyanate gebildet. Ein Nachweis des Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugats nach Verwendung des ^{14}C -markierten Benzylglucosinolats gelang jedoch nicht, weder über das Radiochromatogramm, noch über entsprechend gesammelte Fraktionen. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei der Konjugation des Isothiocyanats mit Glutathion nicht um einen Hauptweg der Entgiftung handelt.

Die Analogie in der Detektierbarkeit der Glutathionkonjugate und des *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-S-D-glucosids lässt auch hier einen Einfluss der möglichen Myrosinasehemmung vermuten. Beide Metabolisierungswege würden nur eine Rolle spielen, wenn die Hemmung der Myrosinase schwach ausfällt und mehr Isothiocyanat freigesetzt wird, als über andere Entgiftungswege umsetzbar ist. Eine weitere Erklärung für das schwankende Auftreten der Konjugate könnte eine Reaktion von Isothiocyanaten, die noch im Kot von der Myrosinase freigesetzt werden, mit Glutathion sein. Isothiocyanate sind reaktive Verbindungen. Unter *in vitro* Bedingungen können sie Disulfidbrücken spalten, wie sie im oxidierten Glutathion vorliegen (Kawakishi und Kaneko, 1985; Kawakishi et al., 1987).

Eine andere Möglichkeit, den schwankenden Beitrag der Konjugation mit Glutathion zum Isothiocyanatmetabolismus in den hier untersuchten Larven zu erklären, wäre eine vorübergehende Bildung der Konjugate. Aufgrund ihres lipophilen Charakters könnten die Isothiocyanate passiv in die Epithelzellen diffundieren, wo es zur

spontanen oder durch GSTs katalysierten Konjugatbildung käme, wie es bei Menschen und Säugetieren der Fall ist (Kassahun et al., 1997; Traka und Mithen, 2009). Glutathion hat neben der Funktion als Substrat in Phase-2-Entgiftungsreaktionen weitere wichtige Funktionen im Stoffwechsel. So fungiert es als Schwefel- und Cysteinspeicher und –Donor, ist aber auch an Redoxreaktionen zum Schutz der Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt. Da Raupen in Relation zu ihrem Körpergewicht sehr viel größere Mengen Isothiocyanate mit der Nahrung aufnehmen als Menschen oder Säugetiere, könnte eine alleinige Entgiftung der Isothiocyanate über die Konjugation mit Glutathion zu einer Glutathionverarmung mit negativen bis letalen Effekten führen. Um das zu verhindern, könnte es zu einer Spaltung der Konjugate mit anschließender Entgiftung durch andere Stoffwechselwege kommen. In Abhängigkeit von der Vollständigkeit der Spaltung der Isothiocyanat-Glutathionkonjugate wären diese in unterschiedlichen Mengen im Kot nachweisbar.

Abschließend kann gesagt werden, dass das Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat auf der Basis der in dieser Arbeit erhaltenen Daten keinen Hauptmetaboliten des aus dem pflanzlichen Gewebe freigesetzten Benzylisothiocyanat darstellt, sondern allenfalls einen sporadisch in geringen Mengen gebildeten Nebenmetaboliten.

4.8 Die Anpassung von generalistischen Lepidoptera an das Glucosinolat-Myrosinase-System: Spezifisch oder unspezifisch?

Für Generalisten wurde eine Anpassung an das Glucosinolat-Myrosinase-System auf Ebene der Hydrolyseprodukte vermutet, da Anpassungsmechanismen auf Ebene der Glucosinolate oder der Hydrolyse spezieller Mechanismen zu bedürfen scheinen. Für die Entgiftung der Hydrolyseprodukte sind dagegen auch allgemeine Entgiftungsreaktionen vorstellbar. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten zeigen erstaunlicherweise, dass die Überwindung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems durch *S. exigua* und *S. littoralis* auf Anpassungsmechanismen an verschiedene Phasen des Systems beruhen. Zum einen kommt es zu einer partiellen Hemmung der Myrosinase, zum anderen zur

Entgiftung der Hydrolyseprodukte. Durch eine Hemmung der Myrosinaseaktivität wird nur ein Teil der Hydrolyseprodukte aus den in der Nahrung enthaltenen Glucosinolaten freigesetzt. Diese Hydrolyseprodukte werden dann metabolisch entgiftet. So kann es zur Ausscheidung sowohl intakten Benzylglucosinolats als auch von Metaboliten der Hydrolyseprodukte kommen. Diese Vorgänge wurden nur für Benzylglucosinolat gezeigt, welches als Modellsubstanz im Fokus dieser Arbeit stand. Ob diese Vorgänge auch für weitere Glucosinolate gültig sind, oder sich strukturbedingt unterscheiden, kann nicht gesagt werden.

Eine ausgeprägte Induzierbarkeit dieser Anpassungsmechanismen von *S. exigua* und *S. littoralis* liegt nicht vor. Besonders bei Generalisten kommt es im Rahmen des Futterpflanzenwechsels mitunter zur Aufnahme von strukturell unterschiedlichen Sekundärstoffen. Zur Entgiftung der unterschiedlichen Strukturen können unterschiedliche metabolische Prozesse nötig sein. Besonders in Hinblick auf ihre Spezifität für die verschiedenen Strukturen können sich die metabolischen Prozesse bzw. die Entgiftungsenzyme unterscheiden. Bei sehr spezifischen Entgiftungsenzymen würde eine Induzierbarkeit des Entgiftungssystems die physiologische Belastung der Larven reduzieren, bei unspezifischen Enzymen ist dieser Effekt nicht zu erwarten. Solch ein induzierbarer Entgiftungsmechanismus liegt der Furanocoumarinentgiftung der beiden Generalistenlarven *Papilio glaucus* und *Papilio canadensis* (beide Lepidoptera: Papilionidae) durch induzierbare Cytochrom-P450-Monooxygenasen zugrunde (Li et al., 2001). Die induzierbare Glucosinolatsulfatase der generalistischen Heuschrecke *S. gregaria* ist ein weiteres Beispiel (Falk und Gershenson, 2007). Die vorliegenden Untersuchungen zeigten keine Hinweise für eine derart ausgeprägte Induzierbarkeit der Entgiftungsmechanismen, aber eine Einstellung des Metabolitenmusters nach ca. 3 Tagen. In einem über 5 Tage geführten Radiotracer-Fraßversuch mit *S. exigua* unterschieden sich die Metabolite in den Proben der ersten Tage stärker hinsichtlich der quantitativen Verteilung der Radioaktivität auf die Peaks bzw. Metabolite, nach 3 Tagen war ein konstanteres Muster detektierbar [Abb. 11]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den Anpassungsmechanismen von *S. exigua* und *S. littoralis* an das Glucosinolat-Myrosinase-System um unspezifische Reaktionswege und entsprechend unspezifische Enzyme handelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werfen die Frage auf, ob diese Kombination aus verschiedenen Mechanismen als Tendenz in der Anpassung von

generalistischen Herbivoren an das Glucosinolat-Myrosinase-System gesehen werden kann. In einem Fraßversuch, in dem die Metabolitenmuster der drei Generalisten *S. exigua*, *S. littoralis* und zusätzlich *T. ni* verglichen wurden, konnten prinzipiell ähnliche Metabolitenmuster erhalten werden [Abb. 12]. In Kombination mit den Daten über das Fehlen von Sequestrierung und Akkumulation von Glucosinolaten deutet sich an, dass die Anpassung der drei Generalisten an das Glucosinolat-Myrosinase-System auf den gleichen Stoffwechselprozessen beruht. Allerdings schied *T. ni* im Unterschied zu *S. exigua* und *S. littoralis* in den beiden mit *T. ni* durchgeführten Versuchen nur einen sehr geringen Anteil an intaktem ¹⁴C-markiertem Benzylglucosinolat aus. Ob das Metabolitenmuster in Zusammenhang mit der Präferenz der Lepidopteren für Brassicaceae steht (*S. exigua* < *S. littoralis* < *T. ni*), läßt sich aus unseren Daten nicht ableiten. Weiterführende Versuche, auch mit weiteren generalistischen Herbivoren mit einer großen Präferenz für Brassicaceae, wie *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), wären hier sehr interessant. Ebenso interessant wäre die Identifizierung der Reaktionswege und der daran beteiligten Enzyme, deren Kenntnis ein vollständigeres Bild der Anpassung generalistischer Herbivoren der Lepidoptera an das Glucosinolat-Myrosinase-System ergeben würde.

5 Zusammenfassung

Pflanzen der Ordnung Brassicales sind gegen Fraßfeinde wie herbivore Insekten durch das Glucosinolat-Myrosinase-System geschützt. Dabei handelt es sich um eine aktivierbare chemische Abwehr. Die in der Pflanze gespeicherten Glucosinolate kommen bei Gewebeverletzung in Kontakt mit der separat gespeicherten Thioglucosidase Myrosinase. Das führt zur schlagartigen Hydrolyse der Glucosinolate zu den eigentlichen Abwehrstoffen, den toxischen Isothiocyanaten und anderen biologisch aktiven Verbindungen. Auf Glucosinolat-haltige Pflanzen spezialisierte Insekten besitzen biochemische Anpassungsmechanismen an dieses Abwehrsystem, die ihnen die Nutzung dieser Pflanzen als Nahrungsquelle ermöglichen. Für generalistische herbivore Insekten, die verschiedene Pflanzen mit unterschiedlichen Sekundärstoffen als Wirtspflanzen nutzen, sind die Anpassungsmechanismen bisher nur wenig untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Mechanismen, die es generalistischen Herbivoren der Lepidoptera ermöglichen, auf Pflanzen zu fressen, die durch das Glucosinolat-Myrosinase-System geschützt sind. Die Untersuchungen wurden mit den polyphagen Lepidopterenlarven *S. exigua* und *S. littoralis* und Benzylglucosinolat als Modellglucosinolat durchgeführt. Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

- 1) Eine Sequestrierung von Benzylglucosinolat oder daraus abgeleiteten Derivaten findet in keinem der untersuchten Organismen statt.
- 2) Die Larven scheiden einen Teil des Benzylglucosinolats unverändert mit dem Kot aus. Intaktes Glucosinolat wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals in relevanten Mengen im Kot eines kauenden herbivoren Insekts nach Fraß auf Glucosinolat-haltigen Pflanzen nachgewiesen. Präparationen von Darmgewebe und Darminhalt von *S. exigua* und *S. littoralis* zeigten *in vitro* einen hemmenden Effekt auf Myrosinase.
- 3) Der größte Teil des von den Larven aufgenommenen Glucosinolats unterliegt der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse. Die Produkte der Hydrolyse werden im Darm

der Larven metabolisiert und dann mit dem Kot ausgeschieden. Die folgenden Hauptmetabolite wurden identifiziert: Hippursäure als Metabolit des Hydrolyseprodukts Phenylacetonitril und *N*-Benzylmalonaminsäure als Metabolit des Hydrolyseprodukts Benzylisothiocyanat. *N*-Benzylmalonaminsäure wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals als Metabolit nachgewiesen. Als Reaktionsweg wird die Oxidation des Benzylisothiocyanats zum Benzylisocyanat und dessen Hydrolyse zum Benzylamin mit anschließender Konjugation mit Malonsäure vorgeschlagen.

4) Sporadisch wurden *N*-Benzyl-dithiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid und Benzylisothiocyanat-Glutathionkonjugat als Metabolite des Benzylisothiocyanats nachgewiesen. Beide Metabolite traten dabei immer zusammen auf. Für die Bildung beider Verbindungen müssen offensichtlich die gleichen, aber noch unbekannten Bedingungen im Stoffwechsel der Larven vorliegen.

5) Eine längere Verweildauer der Larven auf glucosinolathaltigen Pflanzen hatte nur einen geringen Einfluss auf das Muster der Ausscheidungsprodukte.

Auf Grundlage dieser Daten ist davon auszugehen, dass bei den hier untersuchten Generalisten eine Kombination von Myrosinasehemmung und Hydrolyseproduktentgiftung die Nutzung Glucosinolat-haltiger Pflanzen als Nahrungsquelle durch diese Herbivoren erlaubt.

6 Literaturverzeichnis

- Agerbirk, N., C. Müller, C. E. Olsen, and F. S. Chew.** 2006. A common pathway for metabolism of 4-hydroxybenzylglucosinolate in *Pieris* and *Anthocaris* (Lepidoptera: Pieridae). *Biochemical Systematics and Ecology* **34**:189–198.
- Agerbirk, N., C. E. Olsen, E. Poulsen, N. Jacobsen, and P. R. Hansen.** 2010. Complex metabolism of aromatic glucosinolates in *Pieris rapae* caterpillars involving nitrile formation, hydroxylation, demethylation, sulfation, and host plant dependent carboxylic acid formation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**:126–137.
- Agerbirk, N., C. E. Olsen, and H. Sørensen.** 1998. Initial and Final Products, Nitriles, and Ascorbigens Produced in Myrosinase-Catalyzed Hydrolysis of Indole Glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:1563–1571.
- Agerbirk, N., C. E. Olsen, H. B. Topbjerg, and J. C. Sørensen.** 2007. Host plant-dependent metabolism of 4-hydroxybenzylglucosinolate in *Pieris rapae*: Substrate specificity and effects of genetic modification and plant nitrile hydratase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**:1119–1130.
- Agerbirk, N., S. I. Warwick, P. R. Hansen, and C. E. Olsen.** 2008. *Sinapis* phylogeny and evolution of glucosinolates and specific nitrile degrading enzymes. *Phytochemistry* **69**:2937–2949.
- Agrawal, A. A., and N. S. Kurashige.** 2003. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* **29**:1403–1415.
- Ahuja, I., J. Rohloff, and A. M. Bones.** 2010. Defence mechanisms of Brassicaceae: Implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **30**:311–348.

- Aldrich, J. R., J. W. Avery, C. J. Lee, J. C. Graf, D. J. Harrison, and F. Bin.** 1996. Semiochemistry of cabbage bugs (Heteroptera: Pentatomidae: Eurydema and Murgantia). *Journal of Entomological Science* **31**:172–182.
- Aliabadi, A., J. A. A. Renwick, and D. W. Whitman.** 2002. Sequestration of glucosinolates by harlequin bug *Murgantia histrionica*. *Journal of Chemical Ecology* **28**:1749–1762.
- Andréasson, E., L. B. Jørgensen, A. S. Höglund, L. Rask, and J. Meijer.** 2001. Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology* **127**:1750–1763.
- Barth, C., and G. Jander.** 2006. *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant Journal* **46**:549–562.
- Beekweelder, J., W. van Leeuwen, N. M. van Dam, M. Bertossi, V. Grandi, L. Mizzi, M. Soloviev, L. Szabados, J. W. Molthoff, B. Schipper, H. Verbocht, R. C. H. de Vos, P. Morandini, M. G. M. Aarts, and A. Bovy.** 2008. The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **3**.
- Benderoth, M., M. Pfalz, and J. Kroymann.** 2009. Methylthioalkylmalate synthases: Genetics, ecology and evolution. *Phytochemistry Reviews* **8**:255–268.
- Bernardi, R., A. Negri, S. Ronchi, and S. Palmieri.** 2000. Isolation of the epithiospecifier protein from oil-rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed and its characterization. *FEBS Letters* **467**:296–298.
- Bones, A. M., and J. T. Rossiter.** 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum* **97**:194–208.
- Brader, G., M. D. Mikkelsen, B. A. Halkier, and E. Tapio Palva.** 2006. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *Plant Journal* **46**:758–767.

- Bridges, M., A. M. E. Jones, A. M. Bones, C. Hodgson, R. Cole, E. Bartlet, R. Wallsgrove, V. K. Karapapa, N. Watts, and J. T. Rossiter.** 2002. Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **269**:187–191.
- Brown, P. D., J. G. Tokuhisa, M. Reichelt, and J. Gershenzon.** 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62**:471–481.
- Burow, M., A. Losansky, R. Müller, A. Plock, D. J. Kliebenstein, and U. Wittstock.** 2009. The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**:561–574.
- Burow, M., J. Markert, J. Gershenzon, and U. Wittstock.** 2006. Comparative biochemical characterization of nitrile-forming proteins from plants and insects that alter myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates. *FEBS Journal* **273**:2432–2446.
- Burow, M., R. Müller, J. Gershenzon, and U. Wittstock.** 2006. Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* **32**:2333–2349.
- Burow, M., and U. Wittstock.** 2009. Regulation and function of specifier proteins in plants. *Phytochemistry Reviews* **8**:87–99.
- Cabaret, D., S. A. Adediran, R. F. Pratt, and M. Wakselman.** 2003. New substrates for β -lactam-recognizing enzymes: Aryl malonamates. *Biochemistry* **42**:6719–6725.
- Chevolleau, S., N. Gasc, P. Rollin, and J. Tulliez.** 1997. Enzymatic, Chemical, and Thermal Breakdown of 3H-Labeled Glucobrassicin, the Parent Indole Glucosinolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**:4290–4296.

- Cohen, M. B., M. A. Schuler, and M. R. Berenbaum.** 1992. A host-inducible cytochrome P-450 from a host-specific caterpillar: Molecular cloning and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:10920–10924.
- Dicke, M., and I. T. Baldwin.** 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* **15**:167–175.
- Dussourd, D. E., and T. Eisner.** 1987. Vein-cutting behavior: Insect counterploy to the latex defense of plants. *Science* **237**:898–901.
- Ehrlich, P.R., Raven, P. H.** 1964. *Evolution* (Lawrence, Kans) 18:586–608
- El Sayed, G., A. Louveaux, M. Mavratzotis, P. Rollin, and A. Quinsac.** 1996. Effects of glucobrassicin, epiprogoitrin and related breakdown products on locusts feeding: *Schouwia purpurea* and desert locust relationships. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **78**:231–236.
- Fahey, J. W., A. T. Zalcmann, and P. Talalay.** 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**:5–51.
- Falk, K. L., and J. Gershenzon.** 2007. The desert locust, *Schistocerca gregaria*, detoxifies the glucosinolates of *Schouwia purpurea* by desulfation. *Journal of Chemical Ecology* **33**:1542–1555.
- Foo, H. L., L. M. Grønning, L. Goodenough, A. M. Bones, B. E. Danielsen, D. A. Whiting, and J. T. Rossiter.** 2000. Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: Enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *FEBS Letters* **468**:243–246.
- Francis, F., G. Lognay, J. P. Wathelet, and E. Haubruge.** 2002. Characterisation of aphid myrosinase and degradation studies of glucosinolates. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **50**:173–182.
- Francis, F., N. Vanhaelen, and E. Haubruge.** 2005. Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **58**:166–174.

- Ghaout, S., A. Louveaux, A. M. Mainguet, M. Deschamps, and Y. Rahal.** 1991. What defense does *Schouwia purpurea* (Cruciferae) have against the desert locust? - Secondary compounds and nutritive value. *Journal of Chemical Ecology* **17**:1499–1515.
- Goosen, T. C., D. E. Mills, and P. F. Hollenberg.** 2001. Effects of benzyl isothiocyanate on rat and human cytochromes P450: Identification of metabolites formed by P450 2B1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **296**:198–206.
- Halkier, B. A., and J. Gershenzon.** 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**:303–333.
- Hartmann, T.** 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**:2831–2846.
- Hartmann, T., C. Theuring, T. Beuerle, N. Klewer, S. Schulz, M. S. Singer, and E. A. Bernays.** 2005. Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**:391–411.
- Holzinger, F., C. Frick, and M. Wink.** 1992. Molecular basis for the insensitivity of the Monarch (*Danaus plexippus*) to cardiac glycosides. *FEBS Letters* **314**:477–480.
- Hopkins, R. J., N. M. van Dam, and J. J. A. van Loon.** 2009. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology* **54**:57–83.
- Husebye, H., S. Arzt, W. P. Burmeister, F. V. Härtel, A. Brandt, J. T. Rossiter, and A. M. Bones.** 2005. Crystal structure at 1.1 Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β -glucosidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**:1311–1320.
- Husebye, H., S. Chadchawan, P. Winge, O. P. Thangstad, and A. M. Bones.** 2002. Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **128**:1180–1188.

- Ishikawa, T., K. Okazaki, H. Kuroda, K. Itoh, T. Mitsui, and H. Hori.** 2007. Molecular cloning of *Brassica rapa* nitrilases and their expression during clubroot development. *Molecular Plant Pathology* **8**:623–637.
- Ivie, G. W., D. L. Bull, and R. C. Beier.** 1983. Metabolic detoxification: Mechanism of insect resistance to plant psoralens. *Science* **221**:374–376.
- Janobi, A. A. A., R. F. Mithen, A. V. Gasper, P. N. Shaw, R. J. Middleton, C. A. Ortori, and D. A. Barrett.** 2006. Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography-tandem electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **844**:223–234.
- Janowitz, T., I. Trompetter, and M. Piotrowski.** 2009. Evolution of nitrilases in glucosinolate-containing plants. *Phytochemistry* **70**:1680–1686.
- Jones, A. M. E., M. Bridges, A. M. Bones, R. Cole, and J. T. Rossiter.** 2001. Purification and characterisation of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**:1–5.
- Jones, A. M. E., P. Winge, A. M. Bones, R. Cole, and J. T. Rossiter.** 2002. Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**:275–284.
- Kassahun, K., M. Davis, P. Hu, B. Martin, and T. Baillie.** 1997. Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: Identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chemical Research in Toxicology* **10**:1228–1233.
- Kawakishi, S., and T. Kaneko.** 1985. Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. *Phytochemistry* **24**:715–718.
- Kazana, E., T. W. Pope, L. Tibbles, M. Bridges, J. A. Pickett, A. M. Bones, G. Powell, and J. T. Rossiter.** 2007. The cabbage aphid: A walking mustard oil bomb. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**:2271–2277.

- Kelly, P. J., A. Bones, and J. T. Rossiter.** 1998. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* **206**:370–377.
- Kessler, A., and R. Halitschke.** 2007. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. *Current Opinion in Plant Biology* **10**:409–414.
- Kim, J. H., and G. Jander.** 2007. *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on *Arabidopsis* induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant Journal* **49**:1008–1019.
- Kim, J. H., B. W. Lee, F. C. Schroeder, and G. Jander.** 2008. Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant Journal* **54**:1015–1026.
- Kissen, R., J. T. Rossiter, and A. M. Bones.** 2009. The 'mustard oil bomb': Not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews* **8**:69–86.
- Kliebenstein, D., D. Pedersen, B. Barker, and T. Mitchell-Olds.** 2002. Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **161**:325–332.
- Kliebenstein, D. J., J. Kroymann, P. Brown, A. Figuth, D. Pedersen, J. Gershenzon, and T. Mitchell-Olds.** 2001. Genetic control of natural variation in *arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology* **126**:811–825.
- Kolm, R. H., U. H. Danielson, Y. Zhang, P. Talalay, and B. Mannervik.** 1995. Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: Structure-activity studies. *Biochemical Journal* **311**:453–459.
- Koroleva, O. A., A. Davies, R. Deeken, M. R. Thorpe, A. D. Tomos, and R. Hedrich.** 2000. Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiology* **124**:599–608.

- Krul, C., C. Humblot, C. Philippe, M. Vermeulen, M. van Nuenen, R. Havenaar, and S. Rabot.** 2002. Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model. *Carcinogenesis* **23**:1009–1016.
- Lambrix, V., M. Reichelt, T. Mitchell-Olds, D. J. Kliebenstein, and J. Gershenzon.** 2001. The arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* **13**:2793–2807.
- Lao, S. H., C. Loutre, M. Brazier, J. O. D. Coleman, D. J. Cole, R. Edwards, and F. L. Theodoulou.** 2003. 3,4-Dichloroaniline is detoxified and exported via different pathways in *Arabidopsis* and soybean. *Phytochemistry* **63**:653–661.
- Lee, M. S.** 1992. Oxidative conversion by rat liver microsomes of 2-naphthyl isothiocyanate to 2-naphthyl isocyanate, a genotoxicant. *Chemical Research in Toxicology* **5**:791–796.
- Lee, M. S.** 1996. Enzyme induction and comparative oxidative desulfuration of isothiocyanates to isocyanates. *Chemical Research in Toxicology* **9**:1072–1078.
- Li, Q., S. D. Eigenbrode, G. R. Stringam, and M. R. Thiagarajah.** 2000. Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolate concentrations and myrosinase activities. *Journal of Chemical Ecology* **26**:2401–2419.
- Li, W., M. R. Berenbaum, and M. A. Schuler.** 2001. Molecular analysis of multiple CYP6B genes from polyphagous *Papilio* species. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**:999–1011.
- Lichtenstein, E. P., F. M. Strong, and D. G. Morgan.** 1962. Identification of 2-phenylethylisothiocyanate as an insecticide occurring naturally in the edible part of turnips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **10**:30–33.
- Lindigkeit, R., A. Biller, M. Buch, H. M. Schiebel, M. Boppré, and T. Hartmann.** 1997. The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its n-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* **245**:626–636.

- Ma, R., M. B. Cohen, M. R. Berenbaum, and M. A. Schuler.** 1994. Black swallowtail (*Papilio polyxenes*) alleles encode cytochrome P450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **310**:332–340.
- Manguet, A. M., A. Louveaux, G. El Sayed, and P. Rollin.** 2000. Ability of a generalist insect, *Schistocerca gregaria*, to overcome thioglucoside defense in desert plants: Tolerance or adaptation? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **94**:309–317.
- Matern, U., C. Feser, and W. Heller.** 1984. N-malonyltransferases from peanut. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **235**:218–227.
- Matusheski, N. V., R. Swarup, J. A. Juvik, R. Mithen, M. Bennett, and E. H. Jeffery.** 2006. Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:2069–2076.
- Mithen, R.** 2001. Glucosinolates - Biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation* **34**:91–103.
- Moyer, M. P., P. L. Feldman, and H. Rapoport.** 1985. Intramolecular N-H, O-H, and S-H insertion reactions. Synthesis of heterocycles from α -diazo β -keto esters. *Journal of Organic Chemistry* **50**:5223–5230.
- Müller, C.** 2009. Interactions between glucosinolate- and myrosinase-containing plants and the sawfly *Athalia rosae*. *Phytochemistry Reviews* **8**:121–134.
- Müller, C., N. Agerbirk, C. E. Olsen, J. L. Boevé, U. Schaffner, and P. M. Brakefield.** 2001. Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive hemolymph of the sawfly *Athalia rosae*. *Journal of Chemical Ecology* **27**:2505–2516.
- Müller, C., and N. Sieling.** 2006. Effects of glucosinolate and myrosinase levels in *Brassica juncea* on a glucosinolate-sequestering herbivore - and vice versa. *Chemoecology* **16**:191–201.
- Müller, C., and U. Wittstock.** 2005. Uptake and turn-over of glucosinolates sequestered in the sawfly *Athalia rosae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**:1189–1198.

- Müller, R., M. de Vos, J. Y. Sun, I. E. Sønderby, B. A. Halkier, U. Wittstock, and G. Jander.** 2010. Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores. *Journal of Chemical Ecology* **36**:905–913.
- Mumm, R., M. Burow, G. Bukovinskine'Kiss, E. Kazantzidou, U. Wittstock, M. Dicke, and J. Gershenzon.** 2008. Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* **34**:1311–1321.
- Opitz, S. E. W., S. R. Jensen, and C. Müller.** 2010. Sequestration of Glucosinolates and Iridoid Glucosides in Sawfly Species of the Genus *Athalia* and Their Role in Defense Against Ants. *Journal of Chemical Ecology* **36**:148–157.
- Opitz, S. E. W., and C. Müller.** 2009. Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* **19**:117–154.
- Piotrowski, M.** 2008. Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry* **69**:2655–2667.
- Pratt, C., T. W. Pope, G. Powell, and J. T. Rossiter.** 2008. Accumulation of glucosinolates by the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* as a defense against two coccinellid species. *Journal of Chemical Ecology* **34**:323–329.
- Rask, L., E. Andréasson, B. Ekbom, S. Eriksson, B. Pontoppidan, and J. Meijer.** 2000. Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* **42**:93–113.
- Ratzka, A., H. Vogel, D. J. Kliebenstein, T. Mitchell-Olds, and J. Kroymann.** 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:11223–11228.
- Renwick, J. A. A., and K. Lopez.** 1999. Experience-based food consumption by larvae of *Pieris rapae*: Addiction to glucosinolates? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **91**:51–58.
- Rieche, A., D. Martin, and W. Schade.** 1963. Synthetic mustard compounds, V. Synthetische Senfoelbildner, V. *Archiv der Pharmazie* **296**:770–784.

- Sandermann, H., JR., R. Schmitt, H. Eckey, and T. Bauknecht.** 1991. Plant biochemistry of xenobiotics: Isolation and properties of soybean O- and N-glucosyl and O- and N-malonyltransferases for chlorinated phenols and anilines. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **287**:341–350.
- Sarfraz, M., L. M. Dosdall, and B. A. Keddle.** 2006. Diamondback moth-host plant interactions: Implications for pest management. *Crop Protection* **25**:625–639.
- Sarosh, B. R., U. Wittstock, B. A. Halkier, and B. Ekbom.** 2010. The influence of metabolically engineered glucosinolates profiles in *Arabidopsis thaliana* on *Plutella xylostella* preference and performance. *Chemoecology* **20**:1–9.
- Schmidt, B., B. Thiede, and C. Rivero.** 1994. Metabolism of the pesticide metabolites 4-nitrophenol and 3, 4-dichloroaniline in carrot (*Daucus carota*) cell suspension cultures. *Pesticide Science* **40**:231–238.
- Self, L. S., F. E. Guthrie, and E. Hodgson.** 1964. Adaptation of tobacco hornworms to the ingestion of nicotine. *Journal of Insect Physiology* **10**:907–914.
- Shikita, M., J. W. Fahey, T. R. Golden, W. D. Holtzclaw, and P. Talalay.** 1999. An unusual case of 'uncompetitive activation' by ascorbic acid: Purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochemical Journal* **341**:725–732.
- Shroff, R., F. Vergara, A. Muck, A. Svatos, and J. Gershenzon.** 2008. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:6196–6201.
- Sønderby, I. E., F. Geu-Flores, and B. A. Halkier.** 2010. Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* **15**:283–290.
- Talekar, N. S., and A. M. Shelton.** 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual review of entomology*. Vol. 38:275–301.
- Textor, S., and J. Gershenzon.** 2009. Herbivore induction of the glucosinolate-myrosinase defense system: Major trends, biochemical bases and ecological significance. *Phytochemistry Reviews* **8**:149–170.

- Thangstad, O. P., B. Gilde, S. Chadchawan, M. Seem, H. Husebye, D. Bradley, and A. M. Bones.** 2004. Cell specific, cross-species expression of myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis Thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* **54**:597–611.
- Thies, W.** 1988. Isolation of sinigrin and glucotropaeolin from cruciferous seeds. *FETT Wissenschaft Technologie-Fat Sci Technol* **90**: 311–314
- Thies, W.** 1979. Detection and utilization of a glucosinolate sulfohydrolase in the edible snail, *Helix pomatia*. *Naturwissenschaften* **66**:364–365.
- Tookey, H. L.** 1973. Crambe thioglucoside glucohydrolase (EC 3.2.3.1): separation of a protein required for epithiobutane formation. *Canadian Journal of Biochemistry* **51**:1654–1660.
- Traka, M., and R. Mithen.** 2009. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews* **8**:269–282.
- Velasco, P., M. E. Cartea, C. González, M. Vilar, and A. Ordás.** 2007. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* Group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:955–962.
- Vergara, F., A. Svatoš, B. Schneider, M. Reichelt, J. Gershenzon, and U. Wittstock.** 2006. Glycine conjugates in a lepidopteran insect herbivore - The metabolism of benzylglucosinolate in the cabbage white butterfly, *Pieris rapae*. *ChemBioChem* **7**:1982–1989.
- Vergara, F., A. Svatoš, B. Schneider, M. Reichelt, J. Gershenzon, and U. Wittstock.** 2007. Erratum: Glycine conjugates in a lepidopteran insect herbivore - The metabolism of benzylglucosinolate in the cabbage white butterfly, *Pieris rapae* (*ChemBioChem* (2006) **7**, 1982-1989) DOI:10.1002/cbic.200600280. *ChemBioChem* **8**:1757.
- Vorwerk, S., S. Biernacki, H. Hillebrand, I. Janzik, A. Müller, E. W. Weiler, and M. Piotrowski.** 2001. Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta* **212**:508–516.

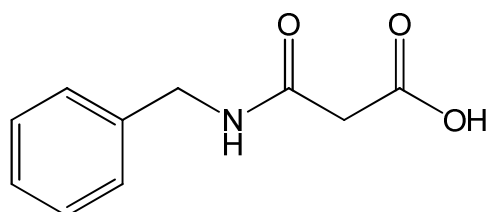
- Wadleigh, R. W., and S. J. Yu.** 1987. Glutathione transferase activity of fall armyworm larvae toward α,β -unsaturated carbonyl allelochemicals and its induction by allelochemicals. *Insect Biochemistry* **17**:759–764.
- Wadleigh, R. W., and S. J. Yu.** 1988. Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three lepidopterous species. *Journal of Chemical Ecology* **14**:1279–1288.
- Wentzell, A. M., and D. J. Kliebenstein.** 2008. Genotype, age, tissue, and environment regulate the structural outcome of glucosinolate activation. *Plant Physiology* **147**:415–429.
- Wheat, C. W., H. Vogel, U. Wittstock, M. F. Braby, D. Underwood, and T. Mitchell-Olds.** 2007. The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:20427–20431.
- Wittstock, U., N. Agerbirk, E. J. Stauber, C. E. Olsen, M. Hippler, T. Mitchell-Olds, J. Gershenzon, and H. Vogel.** 2004. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:4859–4864.
- Wittstock, U., and M. Burow.** 2007. Tipping the scales - Specifier proteins in glucosinolate hydrolysis. *IUBMB Life* **59**:744–751.
- Wittstock, U., and B. A. Halkier.** 2000. Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry* **275**:14659–14666.
- Wittstock, U., and B. A. Halkier.** 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* **7**:263–270.
- Wittstock, U., D. J. Kliebenstein, V. Lambrix, M. Reichelt, J. Gershenzon.** 2003. Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. *In* JT Romeo, ed, *Integrative Phytochemistry: From Ethnobotany to Molecular Ecology*, Vol 37. Elsevier, Amsterdam, pp 101–125

- Yu, S. J.** 1982. Host plant induction of glutathione S-transferase in the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **18**:101–106.
- Yu, S. J.** 1987. Microsomal oxidation of allelochemicals in generalist (*Spodoptera frugiperda*) and semispecialist (*Anticarsia gemmatalis*) insect. *Journal of Chemical Ecology* **13**:423–436.
- Yu, S. J.** 1989. Purification and characterization of glutathione transferases from five phytophagous lepidoptera. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **35**:97–105.
- Zhang, Y., R. H. Kolm, B. Mannervik, and P. Talalay.** 1995. Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **206**:748–755.
- Zrybko, C. L., E. K. Fukuda, and R. T. Rosen.** 1997. Determination of glucosinolates in domestic and wild mustard by high-performance liquid chromatography with confirmation by electrospray mass spectrometry and photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A* **767**:43–52.

7 Anhang

NMR-Daten der *N*-Benzylmalonaminsäure

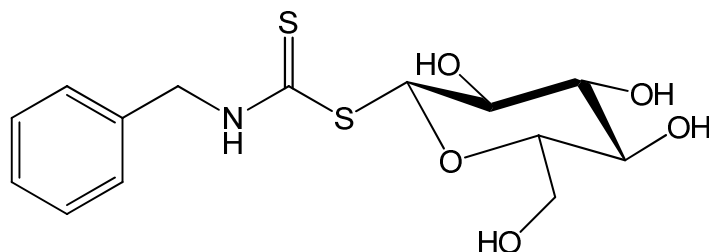
^1H -NMR (600 MHz CD_3OD): δ (ppm) = 7.26-7.33 (m, 4 H, 2-, 3-, 5-, 6-H of benzyl), 7.29- 7.25 (m, 1 H, 4-H of benzyl), 4.43 (d, 2 H, α -H of benzyl), 3.32 (s, 2 H, H 2 of malonamin acid). - ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 170.1 (C_q , $\text{HOC}=\text{O}$), 168.0 (C_q , $\text{NC}=\text{O}$), 136.8 (C_q , C-1 of benzyl), 128.8 (CH, 2 C, C-3,5 of benzyl), 127.8 (CH, 2 C, C-2,6 of benzyl), 43.9 (CH_2 , C- α of benzyl), 38.8 (CH_2 , C-2 malonamin acid)



Strukturformel der *N*-Benzylmalonaminsäure

NMR-Daten des *N*-Benzylthiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosids

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 7.36–7.30 (m, 4 H, 2-, 3-, 5-, 6-H of benzyl), 7.28–7.24 (m, 1 H, 4-H of benzyl), 5.40 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, 1-H), 4.89 (s, 2 H, α -H of benzyl), 3.78 (dd, J = 12.0, 2.1 Hz, 1 H, 6-H), 3.62 (dd, J = 5.3 Hz, 1 H, 6-H'), 3.45–3.32 ppm (m, 4 H, 2-, 3-, 4-, 5-H). – ^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD): δ = 196.3 (C_q , $\text{NSC}=\text{S}$), 138.4 (C_q , C-1 of benzyl), 129.6 (CH, 2 C, C-3,5 of benzyl), 129.2 (CH, 2 C, C-2,6 of benzyl), 128.6 (CH, C-4 of benzyl), 88.7 (CH, C-1), 82.3 (CH, C-5), 79.8 (CH, C-3), 73.1 (CH, C-2), 71.0 (CH, C-4), 62.4 (CH_2 , C-6), 51.1 ppm (CH_2 , C- α of benzyl).



Strukturformel des *N*-Benzylthiocarbamidsäure-*S*-*D*-glucosid

